

**KIRSTEN HAHN**

---

Einflussfaktoren auf spermatologische  
Untersuchungsergebnisse und den  
Erfolg der Kryokonservierung  
von Ziegensperma



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und  
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-  
Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

**Einflussfaktoren auf spermatologische  
Untersuchungsergebnisse und den Erfolg der  
Kryokonservierung von Ziegensperma**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr.med.vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Kirsten Hahn**

Tierärztin aus Lörrach (Baden)

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend  
Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der Disputation 23.11.2016

Meiner Familie



# INHALTSVERZEICHNIS

	<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur</b>	<b>2</b>
2.1	Bedeutung der Haltung von Ziegen und ihrer Produkte weltweit	2
2.1.1	Einsatz der Besamung und Kryokonservierung von Samenzellen in der Ziegenzucht	3
2.1.2	Vor- und Nachteile der Besamung	6
2.1.3	Trächtigkeitsraten nach Besamung	8
2.2	Spermagewinnung von Ziegenböcken	10
2.3	Spermauntersuchung	12
2.3.1	Makroskopische Untersuchung	13
2.3.2	Chemisch-physikalische Untersuchung	15
2.3.3	Mikroskopische Untersuchung	15
2.4	Prinzip der Kryokonservierung	19
2.4.1	Geeignete Verdüner für die Kryokonservierung von Ziegensperma	23
2.4.2	Auftauprozess	25
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1	Probanden	27
3.1.1	Spermagewinnung	27
3.1.2	Spermabeurteilung	28
3.1.2.1	Makroskopische Untersuchung	29
3.1.2.2	Mikroskopische Untersuchung	30
3.1.2.2.1	Lebend-Tot-Färbung	30
3.1.2.2.2	Pathomorphologie	31
3.1.2.2.3	Computer-assisted sperm analysis	31
3.2	Aufbereitung des Spermas für die Kryokonservierung	32
3.2.1	Verdünnung des Spermas	33
3.2.2	Tiefgefrierung des Spermas	33
3.2.3	Auftauen des Spermas	33

3.3	Untersuchung des aufgetauten Tiefgefrierspermas	34
3.4	Auswertung und statistische Verfahren	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1	Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate bei einer Lagerungstemperatur von 20 Grad	37
4.1.1	Makroskopische Untersuchung	37
4.1.2	pH-Wert unterschiedlicher Lagerungsdauer nach Gewinnung	37
4.1.3	Mikroskopische Untersuchung	38
4.1.4	AndroVision®-Untersuchungsergebnisse	41
4.2	Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung nach Kryokonservierung	43
4.2.1	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung der aufgetauten Samenproben nach einem vorherigen Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten oder 30 Minuten	43
4.2.2	AndroVision®-Untersuchungsergebnisse nach dem Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten	45
4.2.3	AndroVision®-Untersuchungsergebnisse nach dem Verdünnungszeitpunkt von 30 Minuten	45
4.3	Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate bei einer Lagerungstemperatur von 37 Grad	46
4.3.1	Makroskopische Untersuchung	46
4.3.2	pH-Wert nach unterschiedlicher Lagerungsdauer nach Gewinnung	46
4.3.3	Mikroskopische Untersuchung	47
4.3.4	AndroVision®-Untersuchungsergebnisse	48
4.4	Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung nach Kryokonservierung	49
4.4.1	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung der aufgetauten Samenproben nach einem vorherigen Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten oder 30 Minuten	50
4.4.2	AndroVision®-Untersuchungsergebnisse nach dem Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten	52



4.4.3	AndroVision®-Untersuchungsergebnisse nach dem Verdünnungszeitpunkt von 30 Minuten	52
4.5	Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Lagerungstemperaturen und den Motilitätsparametern sowie des Lebend-Tot-Verhältnisses der Spermien vor und nach dem Einfrieren	53
4.5.1	Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach der Gewinnung und dem Auftauen auf die Motilitätsparameter und das Lebend-Tot-Verhältnis der Samenzellen	55
4.5.2	Einfluss des Verdünnungszeitpunkts auf die progressive Motilität, das Lebend-Tot-Verhältnis und die Anzahl morphologisch veränderter Samenzellen	57
4.5.3	Zusammenhang zwischen dem pH-Wert des Spermas und der Untersuchungsdauer sowie der unterschiedlichen Lagerungstemperaturen	59
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
5.1	Diskussion der Fragestellung	60
5.2	Diskussion der Methodik	61
5.2.1	Auswahl der Probanden	61
5.2.2	Probengewinnung	62
5.2.3	Untersuchungsmethoden	64
5.3	Diskussion der Ergebnisse	66
5.3.1	Einfluss der verschiedenen Lagerungstemperaturen	66
5.3.2	Einfluss der verschiedenen Untersuchungszeiten vor und nach dem Einfrieren	69
5.3.3	Einfluss der unterschiedlichen Verdünnungszeitpunkte	70
5.3.4	Einflussfaktoren auf den pH-Wert der Ejakulate	73
5.4	Schlussbetrachtung	74
5.5	Offene Fragestellung	76
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>82</b>
8.1.1	Ergebnistabellen	82

<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>112</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASA	computer assisted sperm analysis, computer-assistierte Samenanalyse
CM	Circle Motility, engl. für die Anzahl kreisbeweglicher Spermien
Fa.	Firma
FM	Fast Motility, engl. für die Anzahl schnell beweglicher Spermien
GM	Gesamtbeweglichkeit
IM	Immotile, engl. für die Anzahl unbeweglicher Spermien
LagTemp	Lagerungstemperatur
LVZ	Wechselwirkung der Faktoren „Lagerungstemperatur“, „Untersuchungszeit“ und „Verdünnungszeit“
Max.	Maximum
Min.	Minimum
Mio.	Millionen
Motil.	Motility, engl. für Beweglichkeit
n	Probenzahl
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentration
PM	Progressive Motility, engl. für die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien
SD	standard deviation, engl. für Standardabweichung
SM	Slow Motility, engl. für die Anzahl langsam beweglicher Spermien
Tab.	Tabelle

UntZeit

Untersuchungszeitpunkt

VerdZeit

Verdünnungszeitpunkt

## **1 Einleitung und Fragestellung**

Im Rahmen der spermatologischen Untersuchungen werden verschiedene Parameter erhoben, die dazu dienen die Tauglichkeit eines Ejakulates bzw. einer Besamungsportion zu erfassen. Sie ist damit ein wesentlicher Bestandteil der Zuchttauglichkeitsuntersuchung und im Rahmen der Herstellung von flüssig- oder gefrierkonserviertem Samen unerlässlich. Neben den konventionellen Parametern sind in den letzten Jahren durch die Verwendung der computerassistierten Spermienanalyse neue Beurteilungskriterien hinzugekommen. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen darüber, welche Faktoren Einfluss auf das Ergebnis der spermatologischen Untersuchung nehmen. Ziel dieser Untersuchungen war es, mögliche Einflussfaktoren auf die Resultate der spermatologischen Untersuchung und Kryokonservierung von Ziegensperma zu evaluieren.

Als variable Faktoren für diese Untersuchungen wurden unterschiedliche Lagerungstemperaturen, Untersuchungszeitpunkte und verschiedene Zeitpunkte der Verdünnung der Nativejakulate für die Gefrierkonservierung gewählt.

## **2 Literatur**

### **2.1 Bedeutung der Haltung von Ziegen und ihrer Produkte weltweit**

Ziegen zählen zu den ersten Nutztieren, die vor ungefähr 8000 Jahren domestiziert wurden (Aziz 2010; Boyazoglu et al. 2005). Die Anzahl weltweit gehaltener Ziegen lag nach einer Erhebung der Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) bei 975,8 Millionen Tieren. Davon lebt der Großteil der Tiere in Asien und Afrika (FAOSTAT 2013). In den Entwicklungsländern werden Ziegen in erster Linie zur Selbstversorgung und Existenzsicherung der Familien insbesondere in den ländlichen Regionen gehalten oder die Produkte werden lokal vermarktet (Aziz 2010; Boyazoglu et al. 2005; Dubeuf et al. 2004; Haenlein 2004; Holtz 2005; Naqvi und Kumar 2015). Die gute Anpassungsfähigkeit an trockene klimatische Verhältnisse, ein geringes Nahrungsangebot, eine Toleranz gegenüber Parasiten und Krankheiten und die kleine Größe der Tiere stehen hierbei im Vordergrund (Aziz 2010; Amiridis und Cseh 2012; Morand-Fehr et al. 2004; Notter 2012).

Ziegen werden weltweit zur Herstellung von verschiedenen Produkten gehalten (Aquino et al. 2014; Aziz 2010; Amoah und Gelaye 1997; Dubeuf et al. 2004; Haenlein 1995).

In Europa, insbesondere in Mitteleuropa, ist die Ziegenhaltung vor allem auf die Milchproduktion ausgerichtet. Die Ziegenmilch- und Käseproduktion hat sich dort zu einer wichtigen Industrie entwickelt (Aziz 2010; Boyazoglu et al. 2005; Haenlein 1995; López-Sebastian et al. 2007). Für Menschen, die eine Unverträglichkeit gegenüber Kuhmilchprodukten besitzen, bietet die Ziegenmilch eine Ernährungsalternative (Haenlein 2004). Eine zunehmende Nachfrage nach Ziegenkäseprodukten in Frankreich hat dazu geführt, dass dort die Milchziegenhaltung und Zuchtselektion mittlerweile eine bedeutende Rolle spielt (Dubeuf et al. 2004; Leboeuf et al. 1998). In den Niederlanden zeigt sich ein ähnlicher Trend (Dubeuf et al. 2004). Im Vergleich dazu hat die Milchziegenhaltung in Deutschland mit rund 130.200 Tieren, die vorwiegend in

Süddeutschland leben, nur eine geringe Bedeutung (Hesse et al. 2002; Statistisches Bundesamt 2013).

Ziegen werden auch zur Fleischproduktion gehalten, insbesondere in Ländern wie China oder Indien (Aziz 2010; Dubeuf et al. 2004). Das Fleisch wird hauptsächlich lokal konsumiert oder vermarktet (Dubeuf et al. 2004). In Nordeuropa spielt der Konsum von Ziegenfleisch nur eine untergeordnete Rolle (Dubeuf et al. 2004; Dýrmondsson 2004).

Bestimmte Rassen, wie die Angora- oder Kaschmirziege, werden zur Faserproduktion gezüchtet (Aziz 2010; Dubeuf et al. 2004; Haenlein 1995; Ritar et al. 1992). In manchen Ländern dienen Ziegen als Arbeitstiere zum Tragen von Lasten oder zur Landschaftspflege (Haenlein 1995), in einigen Religionen werden sie als heilige Tiere verehrt (Boyazoglu et al. 2005).

#### **2.1.1 Einsatz der Besamung und Kryokonservierung von Samenzellen in der Ziegenzucht**

Die saisonale Fortpflanzungsperiode der kleinen Wiederkäuer führt zu einer zeitlich begrenzten Verfügbarkeit ihrer Produkte, insbesondere der Milch (Aziz 2010; Fatet et al. 2011). Sie ist damit eine der wichtigsten limitierenden Faktoren in der Ziegenzucht (Pérez und Mateos 1996). Um diese saisonale Einschränkung zu überwinden, wurde die Einführung von assistierten Reproduktionstechniken gefördert (Amiridis und Cseh 2012). Traditionell zählen dazu die Besamung ebenso wie die In-vitro-Fertilisation und die In-vitro-Embryogewinnung, wobei bei kleinen Wiederkäuern vor allem die erst genannte zum Einsatz kommt (Amiridis und Cseh 2012; Baldassarre und Karatzas 2004).

Um eine Optimierung der Produkte durch genetische Selektion zu erzielen, werden Ziegenzuchtprogramme, besonders in Europa, zunehmend weiterentwickelt (Aziz 2010; Haenlein 1995). In den Entwicklungsländern konnte nur eine geringe Anzahl an Zuchtprogrammen eingeführt werden. Wegen der mangelhaften Ausbildung der Ziegenhalter und der vergleichsweise hohen Kosten für die

Verfahren, sind diese größtenteils gescheitert (Aziz 2010; Arredondo et al. 2015).

Die Besamung ist in der modernen Tierzucht unentbehrlich (Amoah und Gelaye 1997; Aziz 2010; Barbas und Mascarenhas 2009) und wird am häufigsten von allen assistierten Reproduktionstechniken bei Nutztieren eingesetzt (Holtz 2005). Ein Großteil der Entwicklung in diesem Bereich fand vor 1980 statt (Foote 2002).

Die artifizielle Insemination ist die erste große Biotechnologie, die zur Verbesserung der Reproduktion und Genetik von Nutztieren verwendet wurde (Aquino et al. 2014; Foote 2002). In der Rinderzucht hat sie sich bereits etabliert, bei Schafen und Ziegen befindet sie sich noch in der Entwicklung (Barbas und Mascarenhas 2009; Foote 2002; Gacitua und Arav 2005). Die Besamung hat bei Ziegen in den letzten Jahren besonders in Europa an Bedeutung zugenommen (Barbas und Mascarenhas 2009). In einigen Gebieten wird dieses Verfahren bei Milchziegen bereits routinemäßig verwendet (Ritar und Salamon 1983). Jedoch ist ihr Einsatz in den Entwicklungsländern, in denen der Großteil der Ziegen weltweit gehalten wird, aufgrund der Kosten begrenzt (Arredondo et al. 2015).

Es besteht ein zunehmendes Interesse an der Verwendung von gefrierkonserviertem Samen für die Insemination und In-vitro-Fertilisation bei Ziegen (Gacitua und Arav 2005). Dadurch kann eine räumliche und zeitliche Trennung zwischen der Spermagewinnung und dem Besamungszeitpunkt erreicht werden (Leboeuf et al. 2000).

Die Besamung ist anders als bei Rindern und Schweinen in der deutschen Ziegenzucht ein kaum übliches Verfahren (Koopmann 2005). In Mitteleuropa spielt die Besamung zur Zucht leistungsfähiger Milchrassen dagegen eine wichtige Rolle (López-Sebastian et al. 2007). Insbesondere in Frankreich hat sich die genetische Selektion in der Milchziegenzucht etabliert (Aziz 2010; Arredondo et al. 2015; Colleau et al. 2011; Dubeuf et al. 2004; Holtz 2005; Leboeuf et al. 1998). Ziegen der Rasse Murciano-Granadina in Spanien gehören zu den wichtigsten Milchziegenrassen, die



im Mittelmeerraum gehalten werden (Salvador et al. 2005). Einige Zuchtprogramme zur Verbesserung der Milchleistung laufen in diesem Land bereits (Aziz 2010; Dubeuf et al. 2004; Salvador et al. 2005). Diese Programme sind aufgrund der geringen Verbreitung und Erfolgsrate der Besamung allerdings noch begrenzt (Salvador et al. 2005). Vor allem die künstliche Besamung mit gefrierkonserviertem Samen ist bei dieser Ziegenrasse wenig verbreitet (Salvador et al. 2005).

In der koreanischen Ziegenzucht besteht großes Interesse an der Forschung zur Verbesserung der Kryokonservierung von Ziegenbocksperma um dieses Verfahren praktikabler zu gestalten (Choe et al. 2006). Nachdem in den USA die Nachfrage nach Ziegenprodukten, insbesondere Milch und Käse, in hohem Maße zugenommen hat und diese mit den bisherigen Importen nicht gedeckt werden konnte (Haenlein 1995), haben sich in den meisten US-Staaten ähnlich wie in Kanada Ziegenzuchtgemeinschaften gebildet (Dubeuf et al. 2004).

Burenziegen werden in Südafrika und China insbesondere für die Fleischproduktion gehalten, auch dort entwickeln sich Zuchtprogramme (Aziz 2010).

Bei den Angoraziegen wird eine genetische Selektion zur Verbesserung der Mohair-Faser-Produktion angestrebt (Ritar et al. 1992). Nachdem zahlreiche argentinische Farmer es sich zur Aufgabe gemacht haben, ihre Angoraziegen-Zucht zu verbessern, besteht dort die Notwendigkeit, genetische Zuchtprogramme auf Grundlage der Insemination mit gefrierkonserviertem Samen einzuführen (Gibbons und Cueto 2011).

Aufgrund der Schwierigkeiten, die bei der Verwendung von flüssigkonserviertem oder gefrierkonserviertem Samen bestehen, wird bei kleinen Wiederkäuern die Insemination meistens mit Frischsamen durchgeführt (Cseh et al. 2012).

Generell ist die Kryokonservierung von Ziegenbocksperma erfolgreicher als bei Schafen (Foote 2002). Während bei Schafen die Besamung nur mit Frischsamen praktisch anwendbar ist, kann bei Ziegen sowohl Frischsamen als auch Tiefgefriersamen erfolgreich eingesetzt werden

(Fischerleitner 2007). Nach Purdy (2006) ist es möglich, tiefgefrorenes Spermia von Ziegenböcken erfolgreich für die Besamung, In-vitro-Fertilisation und die In-vitro-Embryogewinnung zu nutzen. Die Besamung ist eine biotechnische Maßnahme, die nach entsprechender Einschulung erfolgreich von Ziegenhaltern in Form von Eigenbestandsbesamungen durchgeführt werden kann (Fischerleitner 2007).

### **2.1.2 Vor- und Nachteile der Besamung**

Ein wesentlicher Vorteil der Besamung bei Tieren stellt die genetische Selektion und Zuchtverbesserung dar (Allison und Hagevoort 2009; Amiridis und Cseh 2012; Amoah und Gelaye 1997; Aquino et al. 2014; Barbas und Mascarenhas 2009; Bailey et al. 2000; Cseh et al. 2012; Gimenez und Rodning 2007; Leboeuf et al. 2000; Medeiros et al. 2002; Thurston et al. 2002; Salvador et al. 2005). Die Samengewinnung und Portionierung ermöglicht die Befruchtung einer größeren Anzahl an Ziegen durch einen Bock (Allison und Hagevoort 2009). Somit kann es mehr Nachkommen von einem Bock geben, als es auf natürlichem Weg möglich wäre (Baldassarre und Karatzas 2004; Leboeuf et al. 2000). Durch die Konservierung des Samens ist es nicht mehr nötig, einen oder mehrere Böcke im Betrieb zu halten (Koopmann 2005). Die Kosten für die Ziegenbockhaltung können dadurch reduziert bzw. eliminiert werden (Allison und Hagevoort 2009).

Das Risiko der Übertragung von infektiösen Krankheiten wird durch eine Vermeidung des Kontakts zwischen den Tieren und der Aufarbeitung der Samenproben reduziert (Bailey et al. 2000; Cseh et al. 2012; Koopmann 2005; Thurston et al. 2002).

Durch den Einsatz verschiedener Vartiere kann wirksam der Inzuchtproblematik im Bestand begegnet werden (Koopmann 2005). Die Verwendung von gefrierkonserviertem Samen vereinfacht den internationalen Austausch und ermöglicht eine saisonal unabhängige Verfügbarkeit des Spermias (Baldassarre und Karatzas 2004). Die Besamung bietet eine relativ einfache und kostengünstige Methode für

den internationalen Austausch von genetischem Material (Baldassarre und Karatzas 2004). Aufgrund der längeren Haltbarkeit gegenüber gekühltem Sperma, ermöglicht die Kryokonservierung auch weiter abgelegenen Betrieben die Verwendung des Samens eines bestimmten Bockes (Salvador et al. 2005). Mara et al. (2007) entdeckten in ihrer Studie, dass Samen gekühlt bei 4°C für 24 Stunden haltbar ist, ohne dass es zu einer Reduktion der Fruchtbarkeit kommt. Durch die Kryokonservierung ist die Lagerung nahezu unbegrenzt möglich (Dorado et al. 2010; Thurston et al. 2002). Salomon und Maxwell (2000) beschreiben, dass die Gefrierkonservierung von Samenzellen von Schafböcken nach 27 Jahren keinen negativen Einfluss auf die Fertilität zeigte.

Die Verwendung von tiefgefrorenem Samen von geprüften Vererbern verbessert die Milchproduktion und Nachkommenprüfung bei Milchziegen (Choe et al. 2006; Gacitua und Arav 2005). Im Bereich der Angoraziegen-Zucht kann durch selektive Zuchtprogramme die Faserqualität und Fruchtbarkeit der Ziegen verbessert werden (Amoah und Gelaye 1997).

Durch die Kryokonservierung ist es möglich, den Samen eines Tieres nach seinem Tod weiter zu verwenden (Bailey et al. 2000; Baldassarre und Karatzas 2004). Die Bildung und Entwicklung von Genpools vereinfacht Zuchtprogramme und ermöglicht den Erhalt einer Biodiversität (Dorado et al. 2010; Gacitua und Arav 2005). Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Kryokonservierung von Sperma ist die Sicherung von genetischem Material gefährdeter Tierarten bzw. -rassen (Amiridis und Cseh 2012; Barbas und Mascarenhas 2009; Bopapa et al. 2015; Cseh et al. 2012; Dorado et al. 2007; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Leboeuf et al. 2000; Lemma 2011; Medeiros et al. 2002; Watson 2000).

Ein großer Nachteil des Einfrierprozesses ist die Schädigung der Samenzellen, die zu einer reduzierten Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit führt (Barbas und Mascarenhas 2009; Dorado et al. 2010; Medeiros et al. 2002; Ramukhithi et al. 2011; Watson 2000). Die Besamung ist bisher bei kleinen Wiederkäuern noch nicht so weit entwickelt und etabliert wie bei Kühen (Gacitua und Arav 2005). Ziegen zeigen nach der Besamung mit tiefgefrorenem Samen ein breites

Fruchtbarkeitsspektrum (Gacitua und Arav 2005). Die intrauterine Platzierung des Samens ist vor allem bei Schafen, aufgrund ihrer anatomischen Verhältnisse, schwieriger durchzuführen (Gimenez und Rodning 2007; Medeiros et al. 2002).

Die saisonale Fortpflanzungsaktivität der Ziegenböcke wirkt sich auf die Spermaqualität aus (Amoah und Gelaye 1997; Choe et al. 2006; Gacitua und Arav 2005; Loubser und van Niekerk 1983). Als wichtigster Einflussfaktor gilt dabei die Tageslichtlänge (Choe et al. 2006). Durch regelmäßige Spermagewinnung kann diese saisonale Einschränkung positiv beeinflusst werden (Choe et al. 2006). Pérez und Mateos (1996) entdeckten in ihrer Studie, dass die Tageslichtlänge nicht bei jeder Ziegenrasse die gleichen Auswirkungen auf die Samenqualität hat. Bei Damaskus Ziegen hatte das Alter des Bockes und die Jahreszeit einen eindeutigen Einfluss auf die Samenparameter (Al-Ghalban et al. 2004).

### **2.1.3 Trächtigkeitsraten nach Besamung**

Die Konzeptionsraten nach Besamung mit kryokonserviertem Sperma liegen generell niedriger im Vergleich zu Frisch- oder flüssigkonserviertem Samen (Barbas und Mascarenhas 2009, Gacitua und Arav 2005). Das liegt an einer Schädigung der Spermien durch den Einfrierprozess (Barbas und Mascarenhas 2009) und einer daraus resultierenden reduzierten Beweglichkeit um bis zu 40 - 50% (Gacitua und Arav 2005).

Befriedigende Trächtigkeitsraten mit kryokonserviertem Samen bei Ziegen können erreicht werden, vorausgesetzt der Samen wird soweit kranial wie möglich in der Zervix oder direkt intrauterin deponiert (Foote 2002; Ritar und Salamon 1983).

Neben der Fütterung, dem Alter und dem Gesundheits- und Reproduktionsstatus der Tiere, spielen vor allem die Besamungsmethode und die Konservierungsart des Spermas eine entscheidende Rolle für die Trächtigkeitsraten nach Besamung. Nicht jede Ziege eignet sich für dieses Verfahren aufgrund ihres Körpergewichts, ihres Alters, ihrer Gesundheit

ebenso wie der anatomischen individuellen Unterschiede (Loetz 2013). Einen erheblichen Einfluss haben auf jeden Fall die Spermaqualität und der Einfrierprozess (Gacitua und Arav 2005).

Die Konzeptionsraten bei Ziegen nach Besamung mit tiefgefrorenem Samen zeigen eine große Varianz (Gacitua und Arav 2005).

Bei Amoah und Gelaye (1997) lagen sie nach zervikaler Besamung bei 50 - 70%. In Schweden und Norwegen werden die Ziegen hauptsächlich durch die Züchter besamt. Dabei wurden Trächtigkeitsraten mit tiefgefrorenem Sperma von 35,8 bis 44,6% erreicht (Barbas und Macarenhas 2009). Um Trächtigkeitsraten von > 70% mit tiefgefrorenem Sperma zu erzielen, muss der Samen möglichst intrauterin platziert werden (Baldassarre et al. 2009). Dorado et al. (2007) erreichten eine Trächtigkeitsrate von 47,62% nach intrazervikaler Besamung mit kryokonserviertem Samen. Die Konzeptionsraten bei Gacitua und Arav (2005) nach terminierter doppelter Besamung lagen mit Frischsamen bei 60,2% und mit tiefgefrorenem Samen bei 38,9% bzw. mit gewaschenem tiefgefrorenem Sperma bei 41,6%. Salvador et al. (2005) erzielten in ihrer Studie nach zervikaler Besamung von Murciana Ziegen mit tiefgefrorenem Sperma außerhalb der Zuchtsaison nach hormoneller Synchronisation Trächtigkeitsraten von 57%. Dabei wurde das Sperma soweit kranial wie möglich im Genitaltrakt der Ziege platziert. Die Haltung, die Fütterung, die Gesundheit der Tiere, das Reproduktionsmanagement und die Erfahrung der Mitarbeiter auf den Farmen hatten einen entscheidenden Einfluss auf die Trächtigkeitsraten (Salvador et al. 2005). Bei Cseh et al. (2012) lagen die Trächtigkeitsraten nach transzervikaler intrauteriner Besamung von Ziegen mit gefrorenem Samen bei 71%. Dorado et al. (2010) erreichten in ihrer Studie nach einer doppelten intra-zervikalen Besamung bei Florida Ziegen mit tiefgefrorenem Samen Konzeptionsraten von 38% im Durchschnitt.

Gibbons und Cueto (2011) beschreiben in ihrer Studie, dass höhere Trächtigkeitsraten bei den Ziegen nach laparoskopischer Besamung mit gefrorenem Sperma erreicht wurden und die Besamungsdosis erniedrigt werden konnte. Die Konzeptionsraten nach laparoskopischer Besamung

mit flüssigkonserviertem oder tiefgefrorenem Sperma lagen bei über 80% (Amoah und Gelaye 1997). In einer Studie von McKusick et al. (1998) wurden 43,9% der Schafe nach laparoskopischer Besamung tragend im Vergleich zu 20,7% nach transzervikaler Besamung. Watson (2000) beschreibt ebenfalls höhere Trächtigkeitsraten bei Schafen durch die laparoskopische Besamungsmethode. Bei Cseh et al. (2012) lagen die Trächtigkeitsraten bei Ziegen nach laparoskopischer Besamung mit tiefgefrorenem Samen zwischen 60 - 80%.

## **2.2 Spermagewinnung von Ziegenböcken**

Für die Samengewinnung von Ziegenböcken stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei die Verwendung einer künstlichen Vagina (Aquino et al. 2014; Bopapa et al. 2015; Busch und Fischer 2007; Dorado et al. 2010; Fischerleitner 2007; Foote 2002; Gacitua und Arav 2005; Gibbons und Cueto 2011; Holtz 2005; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Leboeuf et al. 2000; Loubser und van Niekerk 1983; Mara et al. 2007; Ritar und Salamon 2006; Roof et al. 2012; Salvador et al. 2005; Sariözkan et al. 2010; Steyn 2009; Sultana et al. 2013; Summermatter und Fuschini 1995; Tha 2005; Vallecillo et al. 2004) und die Elektroejakulation (Al-Ghalban et al. 2004; Bopape et al. 2015; Choe et al. 2006; Foote 2002; Estes et al. 2015; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Kozdrowski et al. 2007; Ramukhithi et al. 2011; Steyn 2009) am häufigsten in der Literatur beschrieben sind. Weibliche Tiere als Sprungpartner erregen die Böcke deutlich stärker als männliche, insbesondere wenn sie brünstig sind. Nach Hoffmann (2003) ist bei trainierten Böcken gegebenenfalls auch ein Phantom zur Stimulierung ausreichend. In der Regel findet die Entnahme in einem separaten Sprungraum statt. Die Samengewinnung ist für Ziegen schwieriger beschrieben als bei Bullen (Colleau et al. 2011).

Der Einsatz einer speziell für Ziegen und Schafe konzipierten künstlichen Scheide für die Samenentnahme kommt dem natürlichen Deckakt der Tiere am nächsten (Bopape et al. 2015). Das Training der Jungböcke für die Samengewinnung mittels künstlicher Vagina kann bereits in einem

Alter von 6-8 Monaten beginnen (Busch und Fischer 2007). Vor der Samenentnahme wird die künstliche Scheide auf eine Temperatur zwischen 40°C (Busch und Fischer 2007) und 42° - 45°C vorgewärmt (Steyn 2009). Die Böcke werden in den Sprungraum geführt, um die weibliche Ziege im Bereich der Genitalregion und Flanken zu beriechen. Danach laufen die Phasen der sexuellen Reflexkette ab. Dazu gehören das Schlagen mit den Vorderbeinen, Flehmen sowie „Zungenflippern“, sogenannten Schnalzlaut (Leboeuf et al. 2000). Nach mehrmaligen Annäherungen erfolgt ohne besondere Vorzeichen der Aufsprung mit schnellen Suchbewegungen und endet mit einem kräftigen Nachstoß (Busch und Fischer 2007; Fischerleitner 2007). Das Ejakulat wird dabei zum Beispiel in einem speziellen graduierten Glasröhrchen aufgefangen (Aquino et al. 2014; Kozdrowski et al. 2007; Ramukhithi et al. 2011; Roof et al. 2012; Sultana et al. 2013).

Die Gesamtbeweglichkeit der Spermien, der Anteil lebender Samenzellen und die Konzentration (Jiménez-Rabadán et al. 2012) waren nach der Gewinnung mittels künstlicher Scheide höher im Vergleich zur Elektroejakulation, bei der das Volumen (Jiménez-Rabadán et al. 2012; Leboeuf et al. 2000) und der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien höher war (Bopape et al. 2015).

Ein wesentlicher Vorteil der Elektroejakulation ist der Verzicht auf ein Training der Böcke und die Anwesenheit eines Sprungpartners (Bopape et al. 2015; Jiménez-Rabadán et al. 2012). Dieses Verfahren eignet sich somit auch für die Samengewinnung von scheuen Tieren, wie zum Beispiel Wildtieren in Narkose (Bopape et al. 2015; Estes et al. 2015). Die Methode kann ebenfalls für Böcke genutzt werden, die die künstliche Scheide ablehnen oder aufgrund von Verletzungen nicht Aufspringen können (Bopape et al. 2015). Außerdem bietet die Elektroejakulation die Möglichkeit den Samen außerhalb der Fortpflanzungsperiode zu gewinnen und zu konservieren, so dass die natürliche Fortpflanzung der Iberiensteinböcke nicht beeinflusst wurde (Santiago-Moreno et al. 2009). Ein bedeutender Nachteil ist die belastende Samenentnahmetechnik für das Tier, die sich teilweise in Vokalisierung und Krämpfen mit Hinlegen

äußert (Bopape et al. 2015). Nach Leboeuf et al. (2000) ist die Samengewinnung durch die Elektroejakulation nicht die bevorzugte Methode.

Über die Häufigkeit der Samenentnahme gibt es in der Literatur verschiedene Angaben zwischen 1x pro Woche (Aquino et al. 2014; Choe et al 2006; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Pérez und Mateos 1996; Ramukhithi et al. 2011; Roof et al. 2012) oder 2 - 3x pro Woche (Busch und Fischer 2007; Dorado et al. 2010; Leboeuf et al. 2000; Sariözkan et al. 2010; Sultana et al. 2013). Leboeuf et al. (1998) beschreiben die Samenentnahmefrequenz für junge Böcke mit 2x pro Woche und ältere Böcke 3 - 5x pro Woche. Sofern möglich kann nach einem Zeitabstand von wenigen Minuten bis zu einer Stunde ein zweites Ejakulat gewonnen werden (Leboeuf et al. 2000; Roof et al. 2012; Summermatter und Fuschini 1995). Kommt es zu einem Nachlass der Spermaqualität, sollte eine 2 - 3 tägige Ruhephase eingehalten werden (Busch und Fischer 2007).

### **2.3 Spermauntersuchung**

Das Ziel der spermatologischen Untersuchung ist die Befruchtungsfähigkeit von Vartieren oder einzelnen Ejakulaten zu beurteilen (Dhurvey et al. 2012; Rodríguez-Martínez 2006; Waberski und Petrunkina 2007). Sie ist damit ein wesentlicher Bestandteil der Zuchtauglichkeitsuntersuchung. Im Rahmen der Herstellung von flüssig- oder gefrierkonserviertem Samen oder der Besamung ist sie unerlässlich (Dorado et al. 2009; Rodríguez-Martínez 2006). Die ermittelten Werte können dann mit den beschriebenen Standardwerten für die verschiedenen Tierarten verglichen werden. Die Ergebnisse liefern eine Information über die zu erwartende Fertilität des Vartiers (Rodríguez-Martínez 2006). Nach Hoffmann (2003) ergibt sich der Beweis der Zeugungsfähigkeit erst aus dem Zuchtergebnis.



In der Regel erfolgt die Samenuntersuchung direkt im Anschluss an die Gewinnung (Pérez und Mateos 1996; Roof et al. 2012). In verschiedenen Studien lagen die Zeitangaben zwischen 2 - 3 Minuten (Tuli und Holtz 1995), nach 20 Minuten (Sariözkan et al. 2010) oder innerhalb einer Stunde nach der Entnahme (Bopape et al. 2015; Choe et al. 2006; Gacitua und Arav 2005). Nach Busch und Fischer (2007) muss das gewonnene Ejakulat innerhalb von 10 Minuten nach der Gewinnung untersucht werden.

Die Lagerungstemperatur während der Untersuchungen beträgt in der Regel 37°C (Bopape et al. 2015; Choe et al. 2006; Kozdrowski et al. 2007; Naing et al. 2011; Pérez und Mateos 1996; Ramukhithi et al. 2011; Roof et al. 2012; Sultana et al. 2013; Tuli und Holtz 1995). Dabei ist es sinnvoll alle Materialien, die in Kontakt mit dem Sperma kommen, auf diese Temperatur vorzuwärmen (Esteso et al. 2015; Santiago-Moreno et al. 2009). In der Studie von Mara et al. (2007) wurde eine Lagerungstemperatur von 30°C während der Untersuchung gewählt, bei Sariözkan et al. (2010) waren es 33°C. Busch und Fischer (2007) legen eine Lagerungstemperatur von 32°C fest. In der Studie von Steyn (2009) betrug die Wasserbadtemperatur für das Sperma während den Untersuchungen 32°- 34°C.

### **2.3.1 Makroskopische Untersuchung**

Zu Beginn der Samenbeurteilung wird die makroskopische Untersuchung durchgeführt. Sie umfasst die Bestimmung des Volumen (Al-Ghalban et al. 2004; Aquino et al. 2014; Choe et al. 2006, Dhurvey et al. 2012; Gacitua und Arav 2005; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Kozdrowski et al. 2007; Loubser und van Niekerk 1983; Ramukhithi et al. 2011; Rodríguez-Martínez 2006; Roof et al. 2012; Steyn 2009; Sultana et al. 2013; Tuli und Holz 1995), der Konsistenz (Aquino et al. 2014; Dhurvey et al. 2012; Steyn 2009; Tuli und Holtz 1995), der Farbe (Aquino et al. 2014; Dhurvey et al. 2012; Sultana et al. 2013; Waberski und Petrunkina 2007), des Geruchs

und das Vorhandensein etwaiger Beimengungen im Ejakulat (Hoffmann 2003; Sultana et al. 2013; Waberski und Petrunkina 2007).

Das Volumen ist generell abhängig von Tierart, Rasse, Alter, Vererbung und Umwelt (Waberski und Petrunkina 2007). Bei den Ziegenböcken hat die saisonale Fortpflanzung einen Einfluss auf das Ejakulatsvolumen (Leboeuf et al. 2000; Waberski und Petrunkina 2007), ebenso wie die Samenentnahmetechnik. Das Volumen ist bei der Elektroejakulation höher als bei der Verwendung einer künstlichen Scheide (Bopape et al. 2015). Dies lässt sich durch den höheren Anteil des Sekrets der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, dem Seminalplasma, erklären (Waberski und Petrunkina 2007). Die Mindestanforderungen an das Ejakulatsvolumen für Ziegenböcke liegen zwischen 0,3 und 1,5 ml (Busch und Fischer 2007) bzw. 0,3 - 3,0 ml (Hoffmann 2003). Das Volumen ist Bestandteil für die Bestimmung der Spermien Gesamtzahl im Ejakulat und eine notwendige Größe für die Berechnung der Anzahl zu produzierender Samenportionen (Waberski und Petrunkina 2007). Die Bestimmung des Volumens erfolgt mit einem graduierten Glas (Bopape et al. 2015; Dorado et al. 2010; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Naing et al. 2011; Sariözkan et al. 2010) oder mit einer Mikropipette (Esteso et al. 2015; Santiago-Moreno et al. 2009).

Die Konsistenz des Ejakulats ist ein Indikator für die Dichte der Probe (Steyn 2009). Sie sollte wässrig bis milchig sein (Busch und Fischer 2007) und wird subjektiv beurteilt (Naing et al. 2011).

Physiologischerweise ist Ziegensperma elfenbeinfarben oder gelblich (Busch und Fischer 2007; Steyn 2009). Die Farbe wird durch die Dichte des Spermas, das Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie etwaige Beimengungen beeinflusst (Hoffmann 2003; Waberski und Petrunkina 2007). Mögliche Beimengungen können Blut, Urin, Kot oder Eiter sein (Sultana et al. 2013; Waberski und Petrunkina 2007).

Tierejakulate sind geruchsneutral, daher ist unter physiologischen Bedingungen lediglich ein „geschlechtsspezifischer“ Geruch wahrzunehmen (Hoffmann 2003; Waberski und Petrunkina 2007).

### **2.3.2 Chemisch-physikalische Untersuchung**

Die chemisch-physikalische Untersuchung des Samens umfasst die Bestimmung des pH-Werts. Veränderungen können durch Erkrankungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen bedingt sein und die Vitalität der Spermien beeinflussen (Waberski und Petrunkina 2007). Unter Routinebedingungen wird der pH-Wert des Samens mit einem Indikatorpapier gemessen (Loubser und van Niekerk 1983). Ein für die Tierart kalibriertes pH-Meter eignet sich ebenfalls für die Bestimmung (Bopape et al. 2015; Greyling und Grobbelaar 1983; Ramukhithi et al. 2011). Bei Wiederkäuern liegt der pH-Wert im leicht sauren Bereich von 6,4 - 7,0 (Waberski und Petrunkina 2007) und speziell für Schaf- und Ziegenböcke zwischen 6,2-6,9 (Hoffmann 2003). Nach Dhurvey et al. (2012) liegt der pH-Wert von Samen mit einer guten Qualität generell im leicht sauren Bereich.

### **2.3.3 Mikroskopische Untersuchung**

Im Anschluss an die makroskopische Untersuchung erfolgt die mikroskopische Beurteilung der Samenzellen. Diese beinhaltet die Beurteilung der Motilität der Spermien, das qualitative und quantitative Vorkommen morphologisch veränderter Samenzellen, die Intaktheit der Plasmamembran sowie die Dichte und Gesamtzahl der Samenzellen (Hoffmann 2003; Panhwar 2008).

Zur Erfassung der Motilität einer unverdünnten Samenprobe eignet sich bei Wiederkäuer ejakulaten die Bestimmung der Massenbewegung (Al-Ghalban et al. 2004; Panhwar 2008; Steyn 2009). Dafür wird ein Tropfen Sperma auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskop unter einer niedrigen Vergrößerung (100x) beurteilt (Al-Ghalban et al. 2004). Sie kann nur bei einer hohen Spermiedichte beurteilt werden (Wehrend und Bostedt 2013). Die

Massenbewegung wird in eine Skala von 0 - 5 eingeteilt, wobei 0: keine Massenbewegung und 5: eine sehr gute Massenbewegung ist (Jiménez-Rabadán et al. 2012; Naing et al. 2011; Steyn 2009; Wehrend und Bostedt 2013). Die Beurteilung sollte so schnell wie möglich nach der Gewinnung erfolgen, da sie der am meisten beeinflussbare Parameter ist (Dhurvey et al. 2012). Eine sehr gute Massenbewegung ist ein Kriterium für eine gute Samenqualität (Panhwar 2008).

Ein direkter Indikator für die Samenqualität ist die Motilität der Spermien (Aquino et al. 2014). Die Einzelbeweglichkeit kann durch die Anfertigung eines Deckglaspräparates mit unverdünntem Samen bei 200- oder 400-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt werden (Al-Ghalban et al. 2004; Dhurvey et al. 2012; Hoffmann 2003; Kozdrowski et al. 2007; Naing et al. 2011; Santiago-Moreno 2009; Sariözkan et al. 2010; Sultana et al. 2013; Vallecillo et al. 2004; Vidal et al. 2013). Das ist nach Dorado et al. (2010) die am häufigsten angewendete Methode um die Beweglichkeit der Samenzellen zu beurteilen. Dabei ist es sinnvoll, Materialien wie Objektträger, die in Kontakt mit dem Sperma kommen auf 37°C (Salvador et al. 2005; Sariözkan et al. 2010; Sultana et al. 2013) oder 38°C vorzuwärmen (Mara et al. 2007). In der Studie von Santiago-Moreno et al. (2009) wurde die Beweglichkeit der Samenzellen erst nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten in einem Wasserbad von 37°C bestimmt.

Die Motilität der Samenzellen setzt sich aus der Vorwärts-, Kreis- und Ortsbeweglichkeit zusammen (Hoffmann 2003). Die Einteilung der Beweglichkeit kann in vier (Al-Ghalban et al. 2004) bis fünf Stufen erfolgen, wobei 0: am niedrigsten und 5: am höchsten ist (Esteso et al. 2015; Santiago-Moreno et al. 2009). Die Untersuchungsmethode ist subjektiv und abhängig von der Erfahrung der untersuchenden Person (Dhurvey et al. 2012). Dennoch wird die Beweglichkeit am häufigsten genutzt, um die Qualität des Samens, der für die Insemination genutzt werden soll, zu beurteilen (Dhurvey et al. 2012). Bei kleinen Wiederkäuern sollte der Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien über 60% liegen (Busch und Fischer 2007) bzw. zwischen 50 - 85% (Hoffmann 2003).

Die Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) bietet eine objektive Möglichkeit zur Erfassung der Motilität sowie anderer Samenparameter (Aboagla und Terada 2004; Bopape et al. 2015; Dhurvey et al. 2012; Hoffmann 2003; Ramukhithi et al. 2011; Roof et al. 2012; Sariözkan et al. 2010; Versteegen et al. 2002; Waberski und Petrunkina 2007). Die Forschungsergebnisse sind in diesem Bereich noch begrenzt im Hinblick auf die Motilitätsanalyse von Samenzellen bei Ziegenböcken (Dorado et al. 2010). Die computerassistierte Spermienanalyse in Kombination mit der traditionellen Spermauntersuchung liefert wertvolle Informationen über die Samenqualität (Dorado et al. 2010).

Zur mikroskopischen Samenuntersuchung zählt außerdem die Bestimmung der Dichte oder Spermienkonzentration. Sie wird klassischerweise nach Verdünnung des Samens mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt (Aquino et al. 2014; Choe et al. 2006; Dhurvey et al. 2012; Dorado et al. 2010; Estes et al. 2015; Hoffmann 2003; Kozdrowski et al. 2007; Loubser und van Niekerk 1983; Naing et al. 2011; Santiago-Moreno et al. 2009; Sultana et al. 2013; Vidal et al. 2013). Die Dichte kann außerdem mittels Spektrophometer (Bopape et al. 2015; Dhurvey et al. 2012; Mara et al. 2007; Pérez und Mateos 1996; Ramukhithi et al. 2011; Vallecillo et al. 2004) oder mit Hilfe eines CASA-Systems gemessen werden (Aboagla und Terada 2004). Für Besamungsstationen ist die exakte Bestimmung der Spermienkonzentration im Ejakulat und im Endprodukt von hoher Bedeutung (Waberski und Petrunkina 2007). Die Spermienkonzentration im Ejakulat von Ziegenböcken sollte bei mehr als 800.000/μl liegen (Busch und Fischer 2007).

Die Funktionalität von Samenzellen ist unmittelbar an die Intaktheit ihrer Plasmamembran gebunden (Hoffmann 2003). Für die Differenzierung von lebenden und toten Spermien werden Farbstoffe verwendet, für die eine intakte Plasmamembran nicht permeabel ist. Es werden in der Regel 200 Spermien ausgewertet (Dhurvey et al. 2012; Estes et al. 2015; Hoffmann 2003; Sariözkan et al. 2010; Tuli und Holtz 1995). Die Zellmembran toter Spermien ist permeabel für den Farbstoff und die Spermienköpfe färben

sich an. Lebende Spermien bleiben nach der Färbung ungefärbt. In einigen Studien wurde dafür der Farbstoff Eosin-Nigrosin verwendet (Aquino et al. 2014; Bopape et al. 2015; Greyling und Grobbelaar 1982; Loubser und van Niekerk 1983; Santiago-Moreno et al. 2009; Sultana et al. 2013; Tuli und Holtz 1995). De Oliveira et al. (2013) wählten in ihrer Studie den Farbstoff Bromphenolblau um den Anteil lebender und toter Spermien von Ziegen zu beurteilen. Pogorzelski (2006) verwendete zur Vitalitätsbeurteilung ebenso wie für die Untersuchung morphologischer Veränderungen der Samenzellen von Schafen die Färbelösung Bromphenol-Nigrosin. Der hypoosmotische Schwelltest bietet eine weitere Möglichkeit um die Intaktheit der Plasmamembran von Samenzellen zu überprüfen (Dhurvey et al. 2012; Estes et al. 2015; Hoffmann 2003; Salvador et al. 2005; Sariözkan et al. 2010). Die Spermien werden dabei in eine schwach hypoosmotische Lösung verbracht (Dhurvey et al. 2012). Samenzellen mit intakter Plasmamembran reagieren beim Verbringen in die Lösung mit einer vermehrten Wasseraufnahme, die zu einer Vergrößerung des Zellvolumens und einer unterschiedlich starken Aufrollung des Schwanzes führt (Dhurvey et al. 2012; Hoffmann 2003).

Ein wesentlicher Bestandteil der spermatologischen Untersuchung ist die Feststellung des Anteils pathomorphologischer Samenzellen (Hoffmann 2003). Morphologische Veränderungen der Spermien treten in jedem Ejakulat auf. Sie unterscheiden sich in ihrem Einfluss auf die Befruchtungsfähigkeit (Rodríguez-Martínez 2013). Es erfolgt eine Auswertung von 200 Spermien (Estes et al. 2015; Santiago-Moreno et al. 2009; Waberski und Petrunkina 2007) mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (Estes et al. 2015; Santiago-Moreno et al. 2009) unter Ölimmersion bei 800 - 1000 -facher Vergrößerung (Dhurvey et al. 2012; Waberski und Petrunkina 2007). Aquino et al. (2014) zählten in ihrer Studie 500 Spermien aus.

Für die Flüssigfixation der Samenprobe eignen sich unter anderem Eosin-Nigrosin (Aquino et al. 2014; Bopape et al. 2015; Dhurvey et al. 2012; Hoffmann 2003), Bengalrosa (Oliveira et al. 2013; Sultana et al. 2013), Bromphenolblau (Aguiar et al. 2013; Oliveira et al. 2009), Bromphenol-

Nigrosin (Pogorzelski 2006), Formolzitrat (Hoffmann 2003; Waberski und Petrunkina 2007) und Glutaraldehyd (Esteso et al. 2015; Pérez und Mateos 1996; Salvador et al. 2005; Santiago-Moreno et al. 2009).

Es wird zwischen primären, sekundären und tertiären Veränderungen differenziert (Dhurvey et al. 2012; Hoffmann 2003). Tritt mehr als eine morphologische Abweichung an demselben Spermium auf, wird nur die schwerwiegendste protokolliert. Dabei wird die Reihenfolge: Halsbrüche – Kopfkappenschäden – Kopfdeformationen – Schwanzveränderungen eingehalten (Waberski und Petrunkina 2007).

Primäre Veränderungen entstehen während der Spermatogenese im Hoden (Dhurvey et al. 2012). Zu ihnen zählen unter anderem die Kopf- oder Akrosomendeformationen, para-/retroaxiale Schwanzansätze und Missbildungen des Mittelstücks (Waberski und Petrunkina 2007). Während des Transports, der Reifung und Lagerung im Nebenhoden können sekundäre Veränderungen an den Spermien auftreten (Dhurvey et al. 2012; Waberski und Petrunkina 2007). Dazu gehören gelöste Kopfkappen, Halsbrüche ebenso wie Schwanzformabweichungen und Plasmotropfen (Waberski und Petrunkina 2007). Die tertiären Veränderungen an den Samenzellen entstehen durch äußere Einflüsse während oder nach der Samengewinnung (Dhurvey et al. 2012; Waberski und Petrunkina 2007). Zu ihnen gehören Kopfkappenablösungen, Schwanzschleifen und Halsbrüche (Waberski und Petrunkina 2007).

Für die Ejakulate von kleinen Wiederkäuern gelten Grenzwerte von maximal 20 % morphologisch veränderter Samenzellen (Busch und Fischer 2007). Störungen der Befruchtungsfähigkeit sind bei einem erhöhten Anteil pathologischer Spermien zu erwarten, in diesem Fall wird von einer Teratozoospermie gesprochen (Hoffmann 2003).

## **2.4 Prinzip der Kryokonservierung**

Eine zeitlich nahezu unbegrenzte Lagerung von Samenzellen lässt sich im Rahmen der Gefrierkonservierung erreichen (Dorado et al. 2010; Thurston

et al. 2002). Die Spermien werden dafür bei  $-196^{\circ}\text{C}$  im flüssigen Stickstoff gelagert (Hoffmann 2003; Lemma 2011). Generell ist eine geringere Beweglichkeit, Fertilität und eine Reduzierung der lebenden Spermien bei gefrierkonserviertem Samen zu erwarten aufgrund der Zellschädigungen durch den Einfrierprozess, mit Ausnahme von Bullen (Barbas und Mascarenhas 2009; Bailey et al. 2003; Dorado et al. 2010; Leboeuf et al. 2000; Medeiros et al. 2002; Watson 2000). Der Anteil der motilen Spermien verringert sich nach dem Auftauen um ungefähr 50% im Vergleich zu Nativsperma (Barbas und Mascarenhas 2009; Gacitua und Arav 2005; Holt 2000; Watson 2000). Nach Dorado et al. (2010) hat die Gefrierkonservierung der Samenzellen keinen Einfluss auf den Anteil morphologisch veränderter Samenzellen.

Die Spermien von Säugetieren sind gegenüber Temperaturabsenkungen sehr empfindlich (Lemma 2011; Medeiros et al. 2002). Es bestehen einige tierartliche und individuelle Unterschiede im Hinblick auf die Gefriertauglichkeit der Samenzellen (Thurston et al. 2002). Dies wird allgemein als „good freezer“ und „bad freezer“ bezeichnet (Leboeuf et al. 2000). Dorado et al. (2010) beschreiben in ihrer Studie signifikante Unterschiede zwischen der Gefriertauglichkeit der Samenzellen von verschiedenen Ziegenböcken. Für die Kryokonservierung von Ziegensperma gibt es bisher kein optimales anerkanntes Standardprotokoll (Roof et al. 2012). Dorado et al. (2010) konnten keinen saisonalen Einfluss auf die Gefriertauglichkeit des Spermas von Ziegenböcken feststellen. Bei Jiménez-Rabadán et al. (2012) war die Samenqualität nach dem Auftauen besser, wenn das Sperma während der Fortpflanzungssaison gewonnen wurde.

Das Prinzip der Kryokonservierung umfasst die Reduzierung der Stoffwechselvorgänge in den Samenzellen und erlaubt dadurch die Lagerung der Spermien über einen undefinierten Zeitraum, möglichst ohne einen signifikanten Verlust der Fertilität (Lemma 2011). Die Gefrierkonservierung beinhaltet die Verdünnung, Temperaturerniedrigung, zelluläre Dehydratation, das Einfrieren und Auftauen der Samenzellen (Hammerstedt et al. 1990; Medeiros et al. 2002). Im Rahmen dieser



Vorgänge kommt es zu morphologischen, biochemischen, strukturellen und funktionellen Veränderungen der Samenzellen (Lemma 2011; Naing et al. 2011; Petrunkina 2007; Salomon und Maxwell 2000). Die strukturellen Veränderungen betreffen in erster Linie die Plasma- und Akrosomenmembran sowie das Akrosom selbst (Lemma 2011; Salomon und Maxwell 2000). Salomon und Maxwell (2000) beschreiben, dass der Aufbau der Mitochondrien durch den Einfrier- und Auftauprozess verändert wird. Während einer langsamen Abkühlrate des Spermias können sich extrazellulär Eiskristalle bilden, die zu einer Veränderung der Osmolarität im extrazellulären Flüssigmedium führen (Bailey et al. 2003; Lemma 2011; Petrunkina 2007; Weitze und Petrunkina 2007). Dadurch tritt Wasser aus den Spermien aus entlang des osmotischen Gradienten und führt zu einer Dehydrierung der Zelle und der Plasmamembran (Bailey et al. 2003; Lemma 2011; Petrunkina 2007). Der umgekehrte Effekt tritt während des Auftauprozesses auf (Bailey et al. 2003; Petrunkina 2007). Im Rahmen einer schnellen Abkühlrate kann es zur intrazellulären Eiskristallbildung kommen, die sich ebenfalls schädigend auf die Samenzellen auswirkt (Lemma 2011; Petrunkina 2007).

Die irreversible Schädigung der Samenzellen durch den Einfrierprozess, der sogenannte Kälteschock, äußert sich in einer Schädigung der Akrosomenmembran, einem Verlust der Zellintegrität und einer Störung der Zellfunktion (Medeiros et al. 2002; Sariözkan et al. 2010).

Große Veränderungen des pH-Wertes können die Samenzellen ebenfalls schädigen (Purdy 2006). Um diesen Schäden entgegenzuwirken müssen den Spermien vor dem Einfrierprozess schützende Stoffe zugefügt werden (Bailey et al. 2003). Sie schützen die Samenzellen gegen die Temperaturveränderungen durch eine Stabilisierung der Plasmamembran und durch die Bereitstellung von Nährstoffen (Vidal et al. 2013). Die Zugabe des Verdünners zu den Samenzellen erfolgt in der Regel zeitnah nach der Gewinnung (Bailey et al. 2003). Die Verdünner bestehen aus Puffersubstanzen (Purdy 2006), Nährstoffen wie Glukose oder Fruktose, Gefrierschutzmitteln und Antibiotika zur Hemmung eines Keimwachstums (Cseh et al. 2012). Die Gefrierschutzmittel werden in penetrierende und

nicht penetrierende Substanzen eingeteilt (Lemma 2011; Petrunkina 2007; Purdy 2006). Penetrierende Gefrierschutzmittel sind in der Lage die Plasmamembran der Samenzellen zu passieren und können dadurch sowohl intra - als auch extrazellulär wirken, während nicht penetrierende Stoffe ihre Wirkung nur extrazellulär erzielen (Lemma 2011). Das am häufigsten verwendete Gefrierschutzmittel für Samenzellen ist Glycerol, ein penetrierender Stoff (Bailey et al. 2003; Medeiros et al. 2002; Purdy 2006; Watson 2000). Verschiedene Zucker wie Laktose und Mannose gehören zusammen mit Lipoproteinen und Eigelb zu den nicht penetrierenden Gefrierschutzmitteln (Lemma 2011).

Der verdünnte Samen wird in spezielle Pailletten (0,25 ml oder 0,5 ml) gefüllt und dann für 1 - 3 Stunden bei 2 - 5°C gekühlt (Salomon und Maxwell 2000; Sariözkan et al. 2010; Tuli und Holtz 1995). An diese Temperaturenniedrigung passen sich die Samenzellen durch eine Herabsetzung ihrer Stoffwechselvorgänge an (Salomon und Maxwell 2000). Danach werden die Pailletten auf eine Vorrichtung in einer Styroporbox 2 - 4 cm oberhalb des flüssigen Stickstoffs verbracht für 4 - 5 Minuten (Leboeuf et al. 2000) oder 8 - 15 Minuten, bevor sie direkt in den flüssigen Stickstoff für die weitere Lagerung umgesetzt werden (Choe et al. 2006; Roof et al. 2012; Sariözkan et al. 2010; Tuli und Holtz 1995). Ziegensperma kann auch in Form von Pellets gefrierkonserviert werden (Leboeuf et al. 2000), wobei die Verwendung von Pailletten häufiger ist (Panhwar 2008).

Als weiteres Verfahren wurde von Choe et al. (2006) ein programmierbares Einfriersystem verwendet, bei dem die Spermien langsamer herunter gekühlt wurden. Die Beweglichkeit und der Anteil lebender Spermien waren signifikant höher bei dem schnelleren Einfrierprozess im Gegensatz zu dem programmierbaren langsameren Einfriersystem.

#### **2.4.1 Geeignete Verdüner für die Kryokonservierung von Ziegensperma**

Die Verdüner, die für die Kryokonservierung von Schaf- und Ziegenbocksperma verwendet werden, enthalten in der Regel Eigelb oder getrocknete Magermilch (Barbas und Mascarenhas 2009; Purdy 2006; Vidal et al. 2013). Ein spezifisches Problem der Konservierung von Samenzellen bei Ziegenböcken ist die geringe Toleranz gegenüber Eigelb im Verdünnermedium (Choe et al. 2006; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Leboeuf et al. 2000; Sariözkan et al. 2010). Die Ursache dafür ist ein Enzym, die Phospholipase A (egg yolk coagulating enzyme = EYEC). Es wird in den Bulbourethraldrüsen der Böcke gebildet und führt zu einer Lyse von Lecithin im Eidotter zu Fettsäuren und Lysolecithin, was toxisch auf die Spermien wirkt (Barbas und Mascarenhas 2009; Busch und Fischer 2007; Choe et al. 2006; Leboeuf et al. 2000; Sariözkan et al. 2010). Um diesem Effekt entgegen zu wirken, sollte ein eidotterfreier Verdüner (Busch und Fischer 2007; Gacitua und Arav 2005) oder ein Verdüner mit einem geringen Anteil an Eigelb (Baldassarre und Karatzas 2004) verwendet werden. Eine ähnliche Unverträglichkeit besteht bei der Verwendung von Verdünnern auf der Basis von Milch (Cseh et al. 2012; Leboeuf et al. 1998; Leboeuf et al. 2000; Pellicer-Rubio und Combarnous 1998). Dabei handelt es sich um ein Protein (SBUIII) aus den Bulbourethraldrüsen, das negativ mit den Milchbestandteilen interagiert (Jiménez-Rabadán et al. 2012; Leboeuf et al. 2000).

Leboeuf et al. (1998) beschreiben die Notwendigkeit, das Seminalplasma vor der Samenkonservierung zu eliminieren. Die Zentrifugation des Spermas bietet eine Möglichkeit das Seminalplasma zu entfernen (Baldassarre und Karatzas 2004; Barbas und Mascarenhas 2009; Busch und Fischer 2007; Leboeuf et al. 2000; Naing et al. 2011; Sariözkan et al. 2010). Purdy (2006) beschreibt diese Verarbeitung des Samens als nützlich aber auch als zeitaufwendig und möglicherweise schädigend für die Samenzellen bei falscher Durchführung. Gacitua und Arav (2005) stellten keine signifikanten Unterschiede auf die Trächtigkeitsraten von Ziegen bei der Verwendung von gewaschenem und nicht gewaschenem Samen fest.

Bei Jiménez-Rabadán et al. (2012) hatte die Entfernung des Seminalplasmas vor der Zugabe des Verdünners ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Samenqualität nach dem Auftauen. In der Studie von Roof et al. (2012) konnten durch eine vorherige Zentrifugation des Spermas die Samenqualität nach dem Auftauen bei der Verwendung eines Verdünners auf Eigelbbasis nicht verbessert werden. Choe et al. (2006) hingegen entdeckten eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate und Beweglichkeit von gefrierkonserviertem Sperma, wenn die Samenzellen vor dem Einfrierprozess gewaschen wurden. In der Studie von Naing et al. (2011) wurde eine signifikante Verbesserung der Samenqualität im Rahmen der Kryokonservierung von Burenziegensperma erzielt durch die Entfernung des Seminalplasmas. Dabei hatten sowohl die verschiedenen Waschlösungen als auch die Einstellungen und Dauer der Zentrifugation einen entscheidenden Einfluss auf die Samenqualität (Naing et al. 2011).

Die Menge an Verdünner für die Kryokonservierung errechnet sich nach der gewünschten Besamungsdosis und der Spermienkonzentration (Purdy 2006). In der Studie von Dorado et al. (2007) wurden für die Kryokonservierung von Ziegensperma zwei Verdünner getestet auf der Basis von TRIS (Triladyl®; Minitüb, Tiefenbach, Germany) und getrockneter Magermilch (Gent®; Minitüb, Tiefenbach, Germany). Beide Verdünner eigneten sich erfolgreich für die Gefrierkonservierung von Ziegensperma (Dorado et al. 2007). Die bestimmten Bewegungsparameter der Samenzellen in der Studie von Dorado et al. (2010) waren bei der Verwendung des TRIS-Verdünners nach dem Auftauen besser als mit dem Verdünner auf Milchbasis. Bei Sariözkan et al. (2010) waren die Samenparameter besser nach der Verdünnung mit Bioxcell, einem eidotterfreien Verdünner, zur Gefrierkonservierung von Ziegensperma im Vergleich zum herkömmlich verwendeten TRIS-Verdünner. Gacitua und Arav (2005) verwendeten in ihrer Studie erfolgreich den eidotterfreien Verdünner Andromed®, der ursprünglich für die Konservierung von Bullensamen entwickelt wurde. In der Studie von Jiménez-Rabadán et al. (2012) wurden gute Ergebnisse erzielt bei der

Verwendung des Andromed®-Verdünners ebenso wie für den Biladyl®-Verdünnern zur Kryokonservierung von Samenzellen von Ziegen. Bei beiden Verdünnern waren die Ergebnisse besser im Gegensatz zu dem Verdünnern auf Milchbasis (Jiménez-Rabadán et al. 2012). Janett et al. (2005) entdeckten, dass die Gesamtbeweglichkeit und Vorwärtsbeweglichkeit nach der Gefrierkonservierung von Ziegensperma bei der Verwendung des Andromed®-Verdünners signifikant höher waren als mit dem TRIS-Verdünnern. Roof et al. (2012) stellten in ihrer Studie fest, dass sich ein Verdünnern auf Sojabasis gut für die Kryokonservierung von Ziegensperma eignet.

#### **2.4.2 Auftauprozess**

Vor der Besamung des Muttertieres oder zur Überprüfung der Gefriertauglichkeit einer Samenprobe werden eine oder mehrere Pailletten aufgetaut. Dies erfolgt in der Regel in einem Wasserbad oder einem speziellen Auftaugerät (Busch und Fischer 2007). Die Temperatur des Wasserbades ist unterschiedlich angegeben zwischen 37- 42°C (Aboagla und Terada 2004; Barbas und Mascarenhas 2009; Choe et al. 2006; Dorado et al. 2009; Dorado et al. 2010; Gacitua und Arav 2005; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Leboeuf et al. 1998; Purdy 2006; Roof et al. 2012; Salvador et al. 2005; Sariözkan et al. 2010; Steyn 2009; Sultana et al. 2013; Tuli und Holtz 1995; Valecillo et al. 2004). Nach Leboeuf et al. (2000) ist eine Auftautemperatur von 37°C praktischer durchzuführen und die Gefahr einer Überhitzung der Samenprobe verringert. Busch und Fischer (2007) empfehlen eine Auftautemperatur von 70°C für 5 Sekunden. Die Dauer des Auftauens variiert zwischen 10 -60 Sekunden oder keiner Zeitangabe (Barbas und Mascarenhas 2009; Choe et al. 2006; Dorado et al. 2009; Dorado et al. 2010; Gacitua und Arav 2005; Jiménez-Rabadán et al. 2012; Purdy 2006; Roof et al. 2012; Salvador et al. 2005; Sariözkan et al. 2010; Sultana et al. 2013; Valecillo et al. 2004). Durch einen schnellen Auftauprozess wird die intrazelluläre Eiskristallbildung in den Samenzellen verhindert (Salomon und Maxwell 2000).

In einigen Studien wurde die aufgetaute Samenprobe nicht sofort untersucht sondern erst nach einer Lagerungsdauer von 2 - 3 Minuten (Aboagla und Terada 2004; Tuli und Holtz 1995) oder 5 Minuten (Jiménez-Rabadán et al. 2012). In der Studie von Steyn (2009) wurden die Samenproben bei einer Temperatur von 37 - 40 °C aufgetaut, danach in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 32 - 34°C verbracht für die weiteren Untersuchungen. Roof et al. (2012) füllten den Samen nach dem Auftauen um, lagerten ihn für 2 Minuten bei 37°C im Wasserbad um den Samen danach erneut zu verdünnen und nochmal für 3 Minuten bei 34°C zu adaptieren bevor die Beweglichkeit mit Hilfe eines CASA-System bestimmt wurde.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Probanden**

Für die Studie wurden Ejakulate von fünf Ziegenböcken der Rasse Pfauenziege verwendet. Die Tiere wurden in Gruppen zusammen gehalten. Alle Böcke hatten jederzeit freien Zugang zu frischem Heu aus einer Heuraufe, einem Mineralleckstein und Wasser. Entsprechend ihres Körpergewichts wurden die Böcke einmal täglich mit Kraftfutter zu gefüttert. Die Tiere waren in Holzboxen untergebracht, die mit Stroh eingestreut waren und Klettermöglichkeiten in Form von Baumstämmen enthielten. Die Boxen waren hell und ausreichend belüftet unter Vermeidung von Zugluft. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren alle Tiere klinisch gesund und in einem guten Ernährungs- und Pflegezustand. Bei allen Böcken wurde in regelmäßigen Abständen eine Klauenpflege durchgeführt. Alle zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden und wiesen weder Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Sexualfunktion noch eine Erkrankung der Geschlechtsorgane auf. Die Ejakulate wurden im Rahmen der klinischen Ausbildung von Studierenden der Veterinärmedizin gewonnen (RP-Nr. GL18/14–Nr.A27/2012).

##### **3.1.1 Spermagewinnung**

Die Spermagewinnung fand bei allen Tieren im Zeitraum Januar 2015 bis April 2015 an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen der praktischen Ausbildung von Studierenden statt.

Die Samenentnahme erfolgte immer unter gleichen Bedingungen in einem separaten Sprungraum, dabei wurden insgesamt zwanzig Ejakulate von fünf verschiedenen Ziegenböcken gewonnen. Zwischen den einzelnen Ejakulatgewinnungen lagen mindestens fünf Tage als Zeitabstand.

Zur sexuellen Stimulation der Böcke dienten zwei bunte deutsche Edelziegen. Die Böcke wurden nach mehrwöchigem Training zunächst in den Sprungraum geführt, um die weibliche Ziege im Bereich der Genitalregion und Flanken zu beriechen. Alle zeigten einen ungestörten Ablauf der Reflexkette vom Schlagen mit den Vorderbeinen und Flehmen sowie „Zungenflippern“, sogenannte Schnalzlaute. Nach mehrmaligen Annäherungen erfolgte der Aufsprung mit schnellen Suchbewegungen und endete mit einem kräftigen Nachstoß. Das Ejakulat wurde mit Hilfe einer künstlichen Vagina für Schafe und Ziegen (Fa. Minitüb, Tiefenbach), die auf 41 Grad vorgeheizt wurde, in einem Glasröhrchen aufgefangen. Über ein Ventil wurde zusätzlich Luft in die Scheide eingeblasen und die Öffnung der Vagina mittels Vaseline gleitfähig gemacht, um die Stimulierung der Böcke zu optimieren. Das gewonnene Ejakulat wurde für den weiteren Versuchsaufbau in mehrere Eppendorf Tubes (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) aufgeteilt und danach sofort in ein Wasserbad verbracht, welches je nach Versuchsaufbau auf 20 oder 37 Grad vorgeheizt war.

### **3.1.2 Spermabeurteilung**

Zu Beginn wurde eine makroskopische Spermauntersuchung durchgeführt. Dabei wurden das Volumen, die Konsistenz, die Farbe, der Geruch und mögliche Beimengungen im Sperma beurteilt. Der pH-Wert wurde alle zehn Minuten mittels Merck Indikatorpapier (Fa. Merck Gruppe, Darmstadt) gemessen. Das Lebend-Tot-Verhältnis und die Pathomorphologie der Spermien wurden nach den klassischen Ejakulatparametern nach Hoffmann (2003c) untersucht. Die Bestimmung der Dichte und Motilität des Spermas erfolgte mittels AndroVision®-System (Fa. Minitüb, Tiefenbach). Eine graphische Übersicht des Versuchsablaufs ist in Abbildung 1 dargestellt.



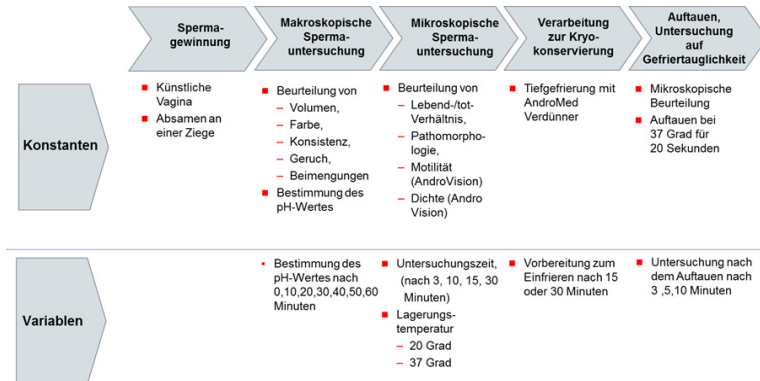


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

### 3.1.2.1 Makroskopische Untersuchung

Direkt nach der Spermagewinnung erfolgte die makroskopische Beurteilung des gewonnenen Ejakulats. Dabei wurden Volumen, Farbe, Geruch, Konsistenz und mögliche Beimengungen beurteilt (Hoffmann, 2003b). Die Bestimmung des Volumens (ml) erfolgte durch grobsinnliche Beurteilung im graduierten Tulpenglas für Bullensperma. Die Mindestanforderungen an das Ejakulatsvolumen von Ziegenböcken liegen zwischen 0,3 bis 1,5 ml (Busch et al. 2007). Für die weiteren Untersuchungen wurden nur Ejakulate mit einem Volumen von mindestens 0,3 ml verwendet.

Physiologischerweise weist Ziegenbocksperma eine elfenbeinfarbene bis gelbliche Farbe auf (Busch et al. 2007). Die Farbe des Spermas wird subjektiv beurteilt, ebenso der Geruch. Dieser sollte geschlechtsspezifisch sein.

Die Konsistenz des Spermas ist im Wesentlichen abhängig von der Dichte. Bei Ziegen sollte sie rahmig bis milchig sein. Sie wird ebenfalls subjektiv beurteilt durch Schwenken des Samenauffangglases.

Alle 10 Minuten, in einem Zeitraum von 0 bis 60 Minuten nach der Ejakulatgewinnung, wurde der pH-Wert mittels Merck Indikatorpapier (Fa. Merck Gruppe, Darmstadt), mit einem Messbereich zwischen 6,4 und 8,0 durchgeführt.

### **3.1.2.2 Mikroskopische Untersuchung**

Je nach Versuchsaufbau wurden die zur mikroskopischen Samenuntersuchung verwendeten Objektträger (76 x 26 mm, Fa. Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig) und Deckgläschen (18 x 18 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim) unter Verwendung eines Heiztisches (HT200, Fa. Hund, Wetzlar) auf 20° bzw. 37° Grad für mindestens 10 Minuten vorgewärmt. Zum Auszählen der lebenden und toten Spermien sowie der pathomorphologisch veränderten Samenzellen wurde ein elektronisches Zählgerät („Assistent“ Counter 345/15, Typ AC-15 PC, Karl Hecht GmbH & Co KG Sondheim) verwendet. Aufgrund der hohen Dichte des Ejakulats, wurden die gewonnenen Proben für die mikroskopischen Untersuchungen in einem Verhältnis von 1 : 29 mit dem AndroMed® - Verdünner (Fa. Minitüb, Tiefenbach) verdünnt.

### **3.1.2.2.1 Lebend-Tot-Färbung**

Die Lebend-Tot Färbung zur Ermittlung des Verhältnisses lebender zu toter Spermien erfolgte mittels Bromphenol-Nigrosin Ausstrich. Die Plasmamembran toter Spermien ist permeabel für den Farbstoff Bromphenol. Mit Hilfe einer Eppendorf - Pipette (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) wurde ein 10 µl großer Tropfen auf einen 20° bzw. 37° Grad vorgewärmten Objektträger gegeben, danach ein doppelt so großer Tropfen der Bromphenol-Färbelösung daneben und dann beides vorsichtig durch mehrmaliges hin und her Schwenken für 20 Sekunden vermischt. Zur Feststellung des Verhältnisses wurden 200 Samenzellen ausgezählt mit Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung im Hellfeld (Leica CME Mikroskop, 1349522X, Fa. Leica, Wetzlar). Dabei wurden nur

Spermien mit vollständig ungefärbten Köpfen der Kategorie „lebend“ zugeordnet.

#### **3.1.2.2.2 Pathomorphologie**

Die Färbung der Spermien für die Beurteilung der pathomorphologischen Veränderungen erfolgt analog zur Lebend-Tot-Färbung mittels Bromphenol-Nigrosin-Lösung. Dabei wurden 200 Spermien mit Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung im Hellfeld (Leica CME Mikroskop, 1349522X, Fa. Leica, Wetzlar) ausgezählt ohne Berücksichtigung ihres Färbemusters. Erfasst wurden Spermien mit Kopf- und Kappenanomalien, Schwanzanomalien, mit Zytoplasmotropfen und losen Köpfen. Nach Zuordnung der gefundenen Formabweichungen zu den jeweiligen Kategorien wurden deren prozentuale Anteile bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Spermien berechnet.

#### **3.1.2.2.3 Computer-assisted sperm analysis**

Ergänzend zur subjektiven Spermabeurteilung wurden computerassistierte spermatologische Analyseverfahren mittels AndroVision®-System (Fa. Minitüb, Tiefenbach) durchgeführt für die Motilitäts- und Konzentrationsbeurteilung des Spermas.

Das System AndroVision® besteht aus folgenden Komponenten:

- Hochgeschwindigkeitsdigitalkamera (schwarz/weiß) mit einer Bildfrequenz von 101/Sekunde und einer Auflösung von 1024x1024 Pixel
- PC Intel® Core mit 3.4 GHz Prozessor und Betriebssystem Microsoft Windows 7 Professional, 24“ LG E2411-Monitor
- Mikroskop Olympus BX41TF (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) mit Heitzisch (38° C)
- Negativ-Hoch-Kontrast Objektiv (UPlanFINH 20x/0,50 Ph 1; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)

Das Mikroskopbild wurde auf dem Computerbildschirm visualisiert und mit Hilfe des Programmes AndroVision® Software Version 1.0.0.5.; 2012 (Fa. Minitüb, Tiefenbach) ausgewertet. Vor Befüllung der Objektträgerkammern musste das gewonnene Ejakulat der Ziegenböcke 1 : 29 (25 µl Sperma und 725 µl Verdünner) mit dem AndroMed-Verdünner( Fa. Minitüb, Tiefenbach) verdünnt werden, da das Ejakulat sonst aufgrund der hohen Dichte nicht ausgewertet werden konnte.

Um eine homogene Verteilung der Spermien in den Eppendorf Tubes® (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) zu erreichen, wurden diese vorher kurz geschwenkt. Die Leja-Zählkammer (20 µm Sample, ca. 3 µl, Fa. Leja Products B. V., Nieuw Vennepe, Niederlande) wurde mit 2,5 µl verdünntem Sperma befüllt und nach Einsaugen der Probe in den kapillären Spalt der Messkammer mittels AndroVision® sofort analysiert. Die Untersuchungen wurden alle bei einer Analysetemperatur von 38°C durchgeführt.

Dabei wurden jeweils verschiedene Gesichtsfelder des Ejakulates in den Messkammern auf dem Objektträger analysiert bis eine Anzahl von mindestens 2000 Spermien ausgewertet wurde und der Mittelwert aus diesen Messungen als Ergebnis verwendet. Bestimmt wurde die Konzentration in  $10^6/\text{ml}$  unter Berücksichtigung der Vorverdünnung. Die Spermien wurden unterteilt in vorwärts-, schnell-, langsam-, kreis-, orts- und unbewegliche Spermien.

### **3.2 Aufbereitung des Spermas für die Kryokonservierung**

Zielvorgabe war eine Gesamtzahl von 100 Mio. Samenzellen bzw. 50 Mio. Spermien pro Besamungsportion bzw. Midi-Paillette. Eingefroren wurden 0,5 ml Pailletten (Fa. Minitüb, Tiefenbach) in -196 Grad Stickstoff. Dabei wurden alle gewonnen Ejakulate verwendet, auch wenn sie nicht den Mindestanforderungen an Nativejakulaten für die Kryokonservierung entsprachen. Die Überprüfung der Gefriertauglichkeit fand frühestens nach 24 Stunden Lagerung im flüssigen Stickstoff statt.

### **3.2.1 Verdünnung des Spermas**

Für die Verdünnung des Spermas wurde der Andromed®-Verdünner (Fa. Minitüb, Tiefenbach), ein eidotterfreier Verdünner, gewählt.

Nach der Berechnung der Dichte wurde sowohl nach 15 Minuten als auch 30 Minuten das Sperma verdünnt und in 0,5 ml Midi-Pailletten (Fa. Minitüb, Tiefenbach) mit einer Pipettierhilfe aufgezogen. Dabei blieb eine Luftblase in der Mitte, und die Paillette wurde danach mit einer Kugel verschlossen und beschriftet. Das verdünnte Ejakulat musste zunächst für 1 - 2 Stunden im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

### **3.2.2 Tiefgefrierung des Spermas**

Zum Tiefgefrieren der Spermaproben wurde eine Metallbox mit einem Styropor Paillettenhalter (ca. 10 cm Höhe) mit flüssigem Stickstoff bis auf 3 cm Höhe befüllt. Mit Hilfe einer Pinzette konnten die Pailletten auf den Styropor-Halter übertragen werden, um sich an die niedrige Temperatur für 10 Minuten zu adaptieren. Die Lagerung auf einer Höhe von 10 cm entspricht ungefähr -140 Grad. Danach wurden die Pailletten einzeln durch eine Pinzette auf den Boden der Metallbox übertragen. Darauf folgte die Umlagerung der Midi-Pailletten in einen Aufbewahrungscontainer.

### **3.2.3 Auftauen des Spermas**

Nach mindestens 24 Stunden Lagerungsdauer im flüssigen Stickstoff bei -196 Grad wurden die Spermaproben aufgetaut. Dies erfolgte in einem Wasserbad bei 37 Grad für 20 Sekunden. Danach wurden die Proben nach den vorgegebenen Zeiten erneut untersucht.

### **3.3 Untersuchung des aufgetauten Tiefgefrierspermas**

Die Untersuchung des Spermas fand nach 3, 5 und 10 Minuten nach dem Auftauen statt. Die Spermaproben wurden bis zur Untersuchung in einem Wasserbad von 37 Grad gelagert.

Die Motilitäts- und Konzentrationsanalyse erfolgte mittels AndroVision®-System (Fa. Minitüb, Tiefenbach). Zur Beurteilung des Lebend-Tot-Verhältnisses und der pathomorphologischen Veränderungen wurde wie oben beschrieben der Bromphenol-Nigrosin-Ausstrich verwendet.

### **3.4 Auswertung und statistische Verfahren**

Die Datensätze dieser Untersuchung wurden alle mit Microsoft® Office Excel 2013 (Microsoft Corporation) verwaltet. Die statistische Bearbeitung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Für die Auswertung der Daten wurden folgende Programme des Statistikprogrammpaketes BMDP / Dynamic, Release 8.1 (1993, BMDP Statistical Software, Inc.) verwendet: BMDP1D (einfache Datenbeschreibung) und BMDP2V (ein- bzw. mehrfaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen). Da die hierarchische Struktur der Proben in dieser Analyse nicht berücksichtigt werden kann, wurde zusätzlich eine Analyse mit Hilfe des generalisierten linearen Modells mit gemischten und hierarchisch gegliederten Effekten bei Effektschätzung mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode mit anschließendem Wald-Test mit dem Statistikprogramm R 3.1.2 (2014, Free Software Foundation's GNU project, R-package lme4 R – Funktion lmer) durchgeführt. Dabei wurde die hierarchische Zugehörigkeit der Proben zu einem bestimmten Ziegenbock als zusätzliche Einflussgröße berücksichtigt.

Eine Varianzanalyse konnte für die Anzahl der morphologisch veränderten Samenzellen nicht angewendet werden, da hier keine Normalverteilung, sondern eine rechtsschiefe Verteilung der Daten vorlag. Da es sich um

Zählergebnisse handelte, erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Poisson–Regression für gemischte hierarchische Modelle mit anschließendem Wald-Test (Programm R 3.1.2, 2014, Free Software Foundation's GNU project, R-package MASS, R-Funktion glmmPQL).

Die einfache graphische Darstellung der Daten wurde mit Microsoft® Office Excel 2013 (Microsoft Corporation) erstellt.

Die einfache Datenbeschreibung erfolgte anhand des arithmetischen Mittelwertes ( $\bar{x}$ ), der Standardabweichung (SD), des Minimums (Min.) und des Maximums (Max.) in der Form  $(\bar{x} \pm SD \text{ (Min., Max.)}$ .

Bei qualitativen Merkmalen (Farbe, Geruch, Konsistenz, makroskopische Beimengungen, mikroskopische Beimengungen) wurde die Merkmalsausprägung als prozentualer Anteil bezogen auf alle Nativejakulate und als totale Anzahl (n) angegeben.

In Anlehnung an den Versuchsplan wurde die statistische Analyse getrennt in den Zeiträumen vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen vorgenommen. Dabei wurden die Einflussgrößen Lagertemperatur, Untersuchungszeit und Zeitpunkt der Verdünnung berücksichtigt.

Bei der statistischen Analyse wurde für jede einzelne Fragestellung, also für jeden separaten Vergleich, das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  verwendet. Die Ergebnisse werden also bei Verwendung eines vergleichsbezogenen Signifikanzniveaus interpretiert. Eine Kontrolle der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit erster Art, bezogen auf die gesamte Studie, wird aufgrund der hohen Anzahl untersuchter Parameter nicht durchgeführt.

Folgende Fragestellungen sollten anhand der erhobenen Daten beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat die Lagerungstemperatur während der spermatologischen Untersuchung auf die Motilität und das Lebend–Tot-Verhältnis der Spermien?
- Verändert sich der pH-Wert des Spermias während einer Untersuchungsdauer von bis zu 60 Minuten?

- Beeinflussen die unterschiedlichen Lagerungstemperaturen von 20°C und 37°C den pH-Wert?
- Welchen Einfluss hat der Untersuchungszeitpunkt des Spermas nach der Gewinnung und nach dem Auftauen auf die Vorwärtsbeweglichkeit und das Lebend-Tot-Verhältnis der Spermien?
- Welche Wirkung auf die Motilität, den Anteil lebender Spermien und die Anzahl morphologisch veränderter Samenzellen hat die Verdünnung und Kühlung des Spermas 15 Minuten oder 30 Minuten nach der Gewinnung zur Vorbereitung auf die Kryokonservierung?



## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate bei einer Lagerungstemperatur von 20 Grad**

#### **4.1.1 Makroskopische Untersuchung**

Das durchschnittliche Volumen der Ejakulate lag bei  $0,48 \text{ ml} \pm 0,11 \text{ ml}$  (Min.  $0,3 \text{ ml}$ , Max.  $0,8 \text{ ml}$ ).

Von allen gewonnen Samenproben ( $n = 20$ ) hatten 80 % ( $n = 16$ ) eine gelbe Farbe und 20 % ( $n = 4$ ) waren elfenbeinfarben. Die Konsistenz der Proben war zu 70 % ( $n = 14$ ) milchig und zu 30 % ( $n = 6$ ) rahmig. Alle Ejakulate hatten einen geschlechtsspezifischen Geruch und zeigten makroskopisch keine Beimengungen.

#### **4.1.2 pH-Wert unterschiedlicher Lagerungsdauer nach Gewinnung**

Zum Zeitpunkt 0 Minuten lag der pH-Wert bei 65 % der Ejakulate ( $n = 13$ ) im Referenzbereich von  $6,4 - 7,0$ . Bei 35 % der Ejakulate ( $n = 7$ ) war der pH-Wert leicht erhöht mit  $7,2$ . Von allen Nativejakulaten ( $n = 20$ ) wurde zum Zeitpunkt 0 Minuten im Durchschnitt ein pH-Wert von  $7,02 \pm 0,19$  (Min.  $6,4$ , Max.  $7,2$ ) gemessen. Da der Messbereich des pH-Indikatorpapieres zwischen  $6,4$  und  $8,0$  liegt, sind alle Werte, die unter diesem Messbereich liegen, mit  $< 6,4$  gekennzeichnet. Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungszeiten sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Darstellung der pH-Werte der Nativejakulate (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C zu den vorgegebenen Untersuchungszeitpunkten durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

Parameter	Zeit (Min.)	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
pH-Wert	0	7,02 $\pm$ 0,19	6,4	7,2
	10	6,97 $\pm$ 0,20	6,4	7,2
	20	6,90 $\pm$ 0,20	6,4	7,2
	30	6,81 $\pm$ 0,21	6,4	7,2
	40	6,79 $\pm$ 0,19	6,4	7,0
	50	6,74 $\pm$ 0,26	< 6,4	7,0
	60	6,69 $\pm$ 0,24	< 6,4	7,0

#### 4.1.3 Mikroskopische Untersuchung

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt (nach 3 Minuten) wurden ein durchschnittlicher Anteil von 65,60  $\pm$  20,88 % lebende Spermien nachgewiesen (Min. 22,50 %, Max. 95,50 %). Die weiteren Ergebnisse der Anzahl lebender und toter Samenzellen zu den anderen Untersuchungszeitpunkten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Durchschnittliche Anzahl der lebenden und toten Samenzellen (%) in den Nativejakulaten (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer Lagerungstemperatur von 20°C zu den festgesetzten Untersuchungszeiten.

<b>Parameter</b>	<b>Zeit (Min.)</b>	<b><math>\bar{x} \pm SD</math></b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
Anzahl lebende Spermien (%)	3	65,60 $\pm$ 20,88	22,50	95,50
	10	60,95 $\pm$ 22,06	14,50	98,50
	15	56,97 $\pm$ 22,01	14,50	94,00
	30	55,55 $\pm$ 21,00	12,50	91,50
Anzahl toter Spermien (%)	3	34,40 $\pm$ 20,88	4,50	77,50
	10	39,05 $\pm$ 22,06	1,50	85,50
	15	43,03 $\pm$ 22, 01	6,00	85,50
	30	44,45 $\pm$ 21,00	8,50	87,50



Abb.2: Abbildung der Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenol-Nigrosin von Ziegenspermien. Nur Spermien mit vollständig ungefärbten Köpfen (weiß) wurden der Kategorie „lebend“ zugeordnet.

Der Anteil morphologisch veränderter Samenzellen betrug im Durchschnitt  $2,80 \pm 3,45 \%$  (Min. 0 %, Max. 15 %). Bei den pathomorphologischen Spermien handelte es sich bei  $1,07 \pm 1,61 \%$  um lose Köpfe (Min. 0 %, Max. 5 %), bei  $0,17 \pm 0,33 \%$  um Kopf- und Kappenveränderungen (Min. 0 %, Max. 1 %), bei  $1,45 \pm 2,50 \%$  um Schwanzveränderungen (Min. 0 %, Max. 11 %) und bei  $0,10 \pm 0,26 \%$  um Plasmotropfen (Min. 0 %, Max. 1 %). Lichtmikroskopisch wurden keine Beimengungen nachgewiesen.

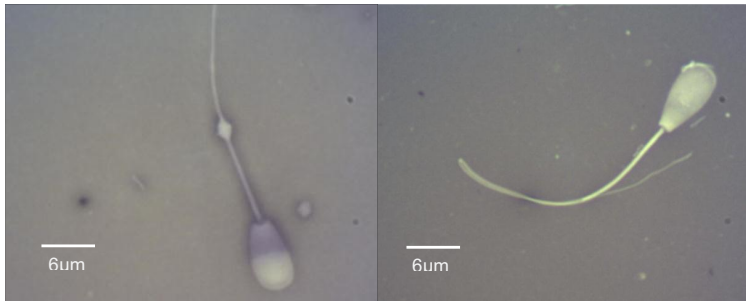


Abb.3 und 4: Abbildungen von Ziegenspermien nach Färbung mit Bromphenol-Nigrosin. Abbildung 3 (links) zeigt ein Spermium mit distalem Zytolplasmatrophen und Abbildung 4 (rechts) ein Spermium mit abgeknicktem Schwanz.

#### 4.1.4 AndroVision®-Untersuchungsergebnisse

Mit Hilfe des AndroVision®-System wurde zum ersten Untersuchungszeitpunkt eine durchschnittliche Dichte bei den gewonnenen Samenproben von  $2,30 \pm 0,77$  Mio./ $\mu\text{l}$  ermittelt (Min. 0,69 Mio./ $\mu\text{l}$ , Max. 3,53 Mio./ $\mu\text{l}$ ). Die Ergebnisse der weiteren Dichtemessungen ebenso wie der Motilitätsanalyse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Messergebnisse der einzelnen durch CASA (AndroVision®-System) bestimmten Dichten und Motilitätsparameter in den Nativejakulaten (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer Lagerungstemperatur von 20°C; dargestellt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

<b>Parameter</b>	<b>3 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>10 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>15 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>30 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>
Dichte (Mio/ $\mu$ l)	2,30 $\pm$ 0,77	2,04 $\pm$ 0,64	2,31 $\pm$ 0,64	2,07 $\pm$ 0,69
Gesamt- beweg- lichkeit (%)	71,72 $\pm$ 24,05	73,16 $\pm$ 23,11	72,17 $\pm$ 23,61	68,72 $\pm$ 24,69
Vorwärts- beweg- liche (%)	71,72 $\pm$ 24,05	73,16 $\pm$ 23,11	72,17 $\pm$ 23,61	68,72 $\pm$ 24,69
Schnell beweg- liche (%)	43,31 $\pm$ 26,42	41,43 $\pm$ 25,48	40,61 $\pm$ 25,99	37,37 $\pm$ 25,04
Kreis beweg- liche (%)	0,70 $\pm$ 0,71	1,07 $\pm$ 1,15	1,02 $\pm$ 1,16	0,98 $\pm$ 1,00
Langsam beweg- liche (%)	27,71 $\pm$ 11,58	30,66 $\pm$ 17,02	30,55 $\pm$ 15,23	30,37 $\pm$ 14,40
Un- beweg- liche (%)	28,28 $\pm$ 24,05	26,84 $\pm$ 23,11	27,83 $\pm$ 23,61	31,28 $\pm$ 24,69

Bei der Untersuchung mit dem AndroVision®-System setzt sich die Gesamtmotilität der Samenzellen aus der Anzahl vorwärtsbeweglicher und ortsbeweglicher Spermien zusammen. Da in allen Versuchen die Anzahl der lokal beweglichen Spermien bei 0 % lag, sind die Werte der Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit identisch. Aus diesem Grund wurden die ortsbeweglichen Spermien nicht in der statistischen Auswertung berücksichtigt.

## 4.2 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung nach Kryokonservierung

Alle Samenproben waren durch den verwendeten Verdünner elfenbeifarben. Der pH-Wert von allen untersuchten Proben lag bei 6,4.

### 4.2.1 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung der aufgetauten Samenproben nach einem vorherigen Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten oder 30 Minuten

Die Ergebnisse des Anteils lebender und toter Samenzellen nach den beiden vorgegebenen Verdünnungszeitpunkten sind in den Tabellen 4 und 5 aufgelistet.

Tabelle 4: Anzahl der lebenden und toten Samenzellen nach dem Auftauen der gefrierkonservierten Proben (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken zu den vorgegebenen Untersuchungszeiten und einem vorherigen Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten sowie einer vorherigen Lagerungstemperatur von 20°C während der spermatologischen Untersuchung.

Parameter	Zeit (Min.)	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Anzahl lebende Spermien (%)	3	41,17 $\pm$ 21,61	10,50	77,00
	5	41,02 $\pm$ 19,84	9,00	74,00
	10	37,72 $\pm$ 21,25	8,50	75,50
Anzahl toter Spermien (%)	3	58,83 $\pm$ 21,61	23,00	89,50
	5	58,98 $\pm$ 19,84	26,00	91,00
	10	62,28 $\pm$ 21,25	24,50	91,50

Tabelle 5: Anzahl der lebenden und toten Samenzellen nach dem Auftauen der gefrierkonservierten Proben (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken zu den vorgegebenen Untersuchungszeiten und einem vorherigen Verdünnungszeitpunkt von 30 Minuten sowie einer vorherigen Lagerungstemperatur von 20°C während der spermatologischen Untersuchung.

Parameter	Zeit (Min.)	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Anzahl lebende Spermien (%)	3	39,27 $\pm$ 19,71	7,00	75,50
	5	39,87 $\pm$ 19,89	8,00	74,00
	10	38,70 $\pm$ 20,45	8,00	78,00
Anzahl toter Spermien (%)	3	60,73 $\pm$ 19,71	24,50	93,00
	5	60,13 $\pm$ 19,89	26,00	92,00
	10	61,30 $\pm$ 20,45	22,00	92,00

Die Anzahl der morphologisch veränderten Samenzellen lag nach dem Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten nach dem Auftauen im Durchschnitt bei 3,45  $\pm$  3,6 % (Min. 0,5 %, Max. 16 %). Dabei handelte es sich bei 2,45  $\pm$  2,87 % (Min. 0 %, Max. 10,5 %) um lose Köpfe, bei 0,20  $\pm$  0,37 % (Min. 0 %, Max. 1,5 %) um Kopf - und Kappenveränderungen, bei 0,75  $\pm$  1,1 % (Min. 0 %, Max. 4 %) um Schwanzveränderungen und bei 0,05  $\pm$  0,22 % (Min. 0 %, Max. 1 %) um Plasmotropfen.

Nach dem Verdünnungszeitpunkt von 30 Minuten lag der Anteil morphologisch veränderter Samenzellen nach dem Auftauen durchschnittlich bei 3,27  $\pm$  2,52 % (Min. 1,0 %, Max. 12 %). Davon waren 1,80  $\pm$  1,62 % (Min. 0 %, Max. 5 %) lose Köpfe, 0,22  $\pm$  0,41 % (Min. 0 %, Max. 1 %) Kopf - und Kappenveränderungen, 1,25  $\pm$  1,45 % (Min. 0 %, Max. 6 %) Schwanzveränderungen und 0 % Plasmotropfen.



#### 4.2.2 AndroVision®-Untersuchungsergebnisse nach dem Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten

Die Ergebnisse der Dichte- und Motilitätsmessungen für die Samenproben nach dem Auftauen bei einer vorherigen Lagerungstemperatur von 20°C, die nach 15 Minuten verdünnt und gekühlt wurden zur Vorbereitung für die Kryokonservierung, sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Messergebnisse der einzelnen durch CASA (AndroVision®-System) bestimmten Dichten und Motilitätsparameter in den aufgetauten Samenproben (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer vorherigen Lagerungstemperatur von 20°C und einem Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten; dargestellt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

Parameter	3 Minuten ( $\bar{x} \pm SD$ )	5 Minuten ( $\bar{x} \pm SD$ )	10 Minuten ( $\bar{x} \pm SD$ )
Dichte (Mio./ $\mu$ l)	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01
Gesambeweglichkeit (%)	47,11 $\pm$ 26,86	49,49 $\pm$ 29,56	49,05 $\pm$ 29,34
Vorwärts bewegliche (%)	47,11 $\pm$ 26,86	49,49 $\pm$ 29,56	49,05 $\pm$ 29,34
Schnell bewegliche (%)	18,04 $\pm$ 13,57	20,30 $\pm$ 16,08	20,12 $\pm$ 17,45
Kreis bewegliche (%)	0,11 $\pm$ 0,14	0,14 $\pm$ 0,14	0,11 $\pm$ 0,15
Langsam bewegliche (%)	28,95 $\pm$ 14,81	29,05 $\pm$ 15,45	28,82 $\pm$ 14,74
Unbewegliche (%)	52,89 $\pm$ 26,86	50,50 $\pm$ 29,56	50,94 $\pm$ 29,34

#### 4.2.3 AndroVision®-Untersuchungsergebnisse nach dem Verdünnungszeitpunkt von 30 Minuten

Die mithilfe des AndroVision®-System bestimmten Spermienkonzentrationen und Motilitätsparameter sind in der folgenden Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Messergebnisse der einzelnen durch CASA (AndroVision® System) bestimmten Spermienkonzentrationen und Motilitätsparameter in den aufgetauten Samenproben (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer vorherigen Lagerungstemperatur von 20°C und einem Verdünnungszeitpunkt von 30 Minuten; dargestellt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

<b>Parameter</b>	<b>3 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>5 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>10 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>
Dichte (Mio./ $\mu$ l)	0,09 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01
Gesambeweglichkeit (%)	42,53 $\pm$ 24,46	43,37 $\pm$ 22,56	46,11 $\pm$ 23,89
Vorwärts bewegliche (%)	42,53 $\pm$ 24,46	43,37 $\pm$ 22,56	46,11 $\pm$ 23,89
Schnell bewegliche (%)	16,36 $\pm$ 14,09	16,33 $\pm$ 12,22	17,78 $\pm$ 13,79
Kreis bewegliche (%)	0,16 $\pm$ 0,22	0,15 $\pm$ 0,26	0,08 $\pm$ 0,14
Langsam bewegliche (%)	26,00 $\pm$ 11,82	26,87 $\pm$ 11,56	28,24 $\pm$ 11,65
Unbewegliche (%)	57,47 $\pm$ 24,46	56,62 $\pm$ 22,56	53,89 $\pm$ 23,89

#### **4.3 Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate bei einer Lagerungstemperatur von 37 Grad**

##### **4.3.1 Makroskopische Untersuchung**

Die Ergebnisse entsprechen den Angaben unter 4.1.1.

##### **4.3.2 pH-Wert nach unterschiedlicher Lagerungsdauer nach Gewinnung**

Die Ergebnisse der pH-Wert Messungen zum Untersuchungszeitpunkt 0 Minuten entsprechen den gleichen Werten, wie unter 4.1.2 angegeben. Die pH-Werte unterhalb von 6,4, die daher außerhalb des Messbereiches des verwendeten pH-Indikatorpapierees lagen, wurden wieder mit < 6,4 bezeichnet. In der nachfolgenden Tabelle 8 sind die weiteren Ergebnisse der pH-Wert Messungen angegeben.

Tabelle 8: Darstellung der pH-Werte der Nativejakulate (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer Lagerungstemperatur von 37 °C zu den vorgegebenen Untersuchungszeitpunkten durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

Parameter	Zeit (Min.)	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
pH-Wert	0	7,02 $\pm$ 0,19	6,4	7,2
	10	6,83 $\pm$ 0,29	6,4	7,7
	20	6,70 $\pm$ 0,33	< 6,4	7,7
	30	6,55 $\pm$ 0,36	< 6,4	7,5
	40	6,50 $\pm$ 0,37	< 6,4	7,5
	50	6,42 $\pm$ 0,29	< 6,4	7,0
	60	6,42 $\pm$ 0,29	< 6,4	7,0

#### 4.3.3 Mikroskopische Untersuchung

Die Ergebnisse der Lebend-Tot-Färbung sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Durchschnittliche Anzahl der lebenden und toten Samenzellen (%) in den Nativejakulaten (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer Lagerungstemperatur von 37°C zu den festgesetzten Untersuchungszeiten.

Parameter	Zeit (Min.)	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Anzahl lebende Spermien (%)	3	65,00 $\pm$ 20,95	15,50	96,00
	10	59,80 $\pm$ 22,35	10,50	89,50
	15	56,80 $\pm$ 20,72	11,50	90,00
	30	51,70 $\pm$ 20,27	9,00	80,50
Anzahl toter Spermien (%)	3	35,00 $\pm$ 20,95	4,00	84,50
	10	40,20 $\pm$ 22,35	10,50	89,50
	15	43,20 $\pm$ 22,72	10,00	88,50
	30	48,30 $\pm$ 20,27	19,50	91,00

Die Anzahl der morphologisch veränderten Samenzellen betrug im Durchschnitt  $2,45 \pm 2,83$  % (Min. 0 %, Max. 13 %). Bei den pathomorphologischen Spermien handelte es sich bei  $0,97 \pm 1,15$  % um lose Köpfe (Min. 0 %, Max. 4,5 %), bei  $0,25 \pm 0,30$  % um Kopf- und Kappenveränderungen (Min. 0 %, Max. 1 %), bei  $1,20 \pm 2,3$  % um Schwanzveränderungen (Min. 0 %, Max. 10,5 %) und bei  $0,25 \pm 0,11$  % um Plasmotropfen (Min. 0 %, Max. 0,5 %). Lichtmikroskopisch wurden keine Beimengungen nachgewiesen.

#### **4.3.4 AndroVision®-Untersuchungsergebnisse**

Die Ergebnisse der CASA-Messungen befinden sich in Tabelle 10. Wie in 4.1.4 beschrieben, wurden die ortsbeweglichen Samenzellen nicht in die statistische Auswertung einbezogen.

Tabelle 10: Messergebnisse der einzelnen durch CASA (AndroVision® System) bestimmten Dichten und Motilitätsparameter in den Nativejakulaten (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer Lagerungstemperatur von 37°C; dargestellt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

<b>Parameter</b>	<b>3 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>10 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>15 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>30 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>
Dichte (Mio/ $\mu$ l)	2,34 $\pm$ 0,85	2,26 $\pm$ 0,93	2,50 $\pm$ 0,96	2,22 $\pm$ 0,85
Gesamt- beweg- lichkeit (%)	73,84 $\pm$ 22,85	67,78 $\pm$ 24,14	71,58 $\pm$ 27,64	59,90 $\pm$ 27,01
Vorwärts- beweg- liche (%)	73,84 $\pm$ 22,85	67,78 $\pm$ 24,14	71,58 $\pm$ 27,64	59,90 $\pm$ 27,01
Schnell beweg- liche (%)	42,61 $\pm$ 27,82	36,99 $\pm$ 25,81	39,97 $\pm$ 26,16	28,18 $\pm$ 24,06
Kreis beweg- liche (%)	1,23 $\pm$ 2,58	0,87 $\pm$ 0,93	0,78 $\pm$ 1,19	0,62 $\pm$ 1,01
Langsam beweg- liche (%)	29,60 $\pm$ 16,58	29,91 $\pm$ 11,32	30,82 $\pm$ 17,59	31,10 $\pm$ 14,30
Un- beweg- liche (%)	26,15 $\pm$ 22,85	32,22 $\pm$ 24,14	28,42 $\pm$ 27,65	40,09 $\pm$ 27,01

#### **4.4 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung nach Kryokonservierung**

Die Ergebnisse entsprechen denselben Angaben wie unter 4.2 beschrieben.

#### 4.4.1 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung der aufgetauten Samenproben nach einem vorherigen Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten oder 30 Minuten

Die Ergebnisse des Anteils lebender und toter Samenzellen in den aufgetauten Samenproben nach den beiden vorgegebenen Verdünnungszeitpunkten sind in den Tabellen 11 und 12 angegeben.

Tabelle 11: Anzahl der lebenden und toten Samenzellen nach dem Auftauen in den gefrierkonservierten Proben (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken zu den vorgegebenen Untersuchungszeiten und einem vorherigen Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten sowie einer vorherigen Lagerungstemperatur von 37°C während der spermatologischen Untersuchung.

Parameter	Zeit (Min.)	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Anzahl lebende Spermien (%)	3	36,05 $\pm$ 18,97	8,50	71,00
	5	37,75 $\pm$ 19,84	7,00	73,00
	10	36,27 $\pm$ 19,83	6,00	72,00
Anzahl toter Spermien (%)	3	63,95 $\pm$ 18,97	29,00	91,50
	5	62,25 $\pm$ 19,84	27,00	93,00
	10	63,73 $\pm$ 19,83	28,00	94,00

Tabelle 12: Anzahl der lebenden und toten Samenzellen nach dem Auftauen der gefrierkonservierten Proben (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken zu den vorgegebenen Untersuchungszeiten und einem vorherigen Verdünnungszeitpunkt von 30 Minuten sowie einer vorherigen Lagerungstemperatur von 37°C während der spermatologischen Untersuchung.

Parameter	Zeit (Min.)	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Anzahl lebende Spermien (%)	3	34,70 $\pm$ 16,57	5,00	66,50
	5	33,32 $\pm$ 17,31	7,00	68,50
	10	31,00 $\pm$ 15,67	3,00	55,50
Anzahl toter Spermien (%)	3	65,30 $\pm$ 16,57	33,50	95,00
	5	66,68 $\pm$ 17,31	31,50	93,00
	10	69,00 $\pm$ 15,67	44,50	97,00

Die Anzahl der morphologisch veränderten Samenzellen lag nach dem früheren Verdünnungszeitpunkt nach dem Auftauen durchschnittlich bei  $2,90 \pm 1,72$  % (Min. 1 %, Max. 7,5 %). Dabei handelte es sich bei  $2,05 \pm 1,48$  % (Min. 0 %, Max. 5 %) um lose Köpfe, bei  $0,25 \pm 0,47$  % (Min. 0 %, Max. 1,5 %) um Kopf - und Kappenveränderungen, bei  $0,60 \pm 0,86$  % (Min. 0 %, Max. 3 %) um Schwanzveränderungen und bei 0 % um Plasmotropfen.

Nach dem späteren Verdünnungszeitpunkt lagen die morphologischen Veränderungen der Samenproben nach dem Auftauen durchschnittlich bei  $3,15 \pm 2,40$  % (Min. 0,5 %, Max. 8 %). Davon waren  $2,35 \pm 1,96$  % (Min. 0 %, Max. 7,5 %) lose Köpfe,  $0,12 \pm 0,27$  % (Min. 0 %, Max. 1 %) Kopf - und Kappenveränderungen,  $0,67 \pm 0,84$  % (Min. 0 %, Max. 3 %) Schwanzveränderungen und 0 % Plasmotropfen.

#### 4.4.2 AndroVision®-Untersuchungsergebnisse nach dem Verdünnungszeitpunkt von 15 Minuten

Die gemessenen Motilitätsparameter zeigten eine stetige Zunahme der gesamt- und vorwärtsbeweglichen Spermien mit zunehmender Untersuchungsdauer. Die Einzelergebnisse ebenso wie die Spermienkonzentrationen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Messergebnisse der einzelnen durch CASA (AndroVision® System) bestimmten Spermienkonzentrationen und Motilitätsparameter in den aufgetauten Samenproben (n =20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer vorherigen Lagerungstemperatur von 37°C und einem Verdünnungszeitpunkt von 15 Min; dargestellt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

Parameter	3 Minuten ( $\bar{x} \pm SD$ )	5 Minuten ( $\bar{x} \pm SD$ )	10 Minuten ( $\bar{x} \pm SD$ )
Dichte (Mio./ $\mu$ l)	0,09 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02
Gesambeweglichkeit (%)	36,41 $\pm$ 23,08	40,62 $\pm$ 23,09	44,89 $\pm$ 26,17
Vorwärts bewegliche (%)	36,41 $\pm$ 23,08	40,62 $\pm$ 23,09	44,89 $\pm$ 26,17
Schnell bewegliche (%)	12,54 $\pm$ 9,97	15,24 $\pm$ 10,84	18,89 $\pm$ 14,32
Kreis bewegliche (%)	0,09 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,18	0,12 $\pm$ 0,17
Langsam bewegliche (%)	23,77 $\pm$ 15,26	25,25 $\pm$ 13,86	25,87 $\pm$ 13,39
Unbewegliche (%)	63,59 $\pm$ 23,08	59,38 $\pm$ 23,09	55,11 $\pm$ 26,17

#### 4.4.3 AndroVision®-Untersuchungsergebnisse nach dem Verdünnungszeitpunkt von 30 Minuten

In der Tabelle 14 sind die mit Hilfe des CASA-Systems gemessenen Spermienkonzentrationen und Motilitätsparameter aufgeführt.



Tabelle 14: Messergebnisse der einzelnen durch CASA (AndroVision® System) bestimmten Spermienkonzentrationen und Motilitätsparameter in den aufgetauten Samenproben (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer vorherigen Lagerungstemperatur von 37°C und einem Verdünnungszeitpunkt von 30 Min; dargestellt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

<b>Parameter</b>	<b>3 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>5 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>10 Minuten (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>
Dichte (Mio./ $\mu$ l)	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02
Gesambeweglichkeit (%)	34,95 $\pm$ 22,09	36,38 $\pm$ 21,76	40,04 $\pm$ 23,86
Vorwärts bewegliche (%)	34,95 $\pm$ 22,09	36,38 $\pm$ 21,76	40,04 $\pm$ 23,86
Schnell bewegliche (%)	11,27 $\pm$ 8,79	12,27 $\pm$ 8,76	13,13 $\pm$ 9,23
Kreis bewegliche (%)	0,09 $\pm$ 0,14	0,03 $\pm$ 0,07	0,04 $\pm$ 0,07
Langsam bewegliche (%)	23,59 $\pm$ 14,39	24,07 $\pm$ 13,84	26,86 $\pm$ 16,39
Unbewegliche (%)	65,04 $\pm$ 22,09	63,62 $\pm$ 21,76	59,96 $\pm$ 23,86

#### **4.5 Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Lagerungstemperaturen und den Motilitätsparametern sowie des Lebend-Tot-Verhältnisses der Spermien vor und nach dem Einfrieren**

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde kein statistisch signifikanter Einfluss der beiden verwendeten Lagerungstemperaturen auf die Anzahl der lebenden und toten Samenzellen in den Nativejakulaten nachgewiesen ( $p = 0,3079$ ). Dieses Ergebnis konnte durch das generalisierte lineare Modell mit gemischten und hierarchisch gegliederten Effekten mit anschließendem Wald-Test bestätigt werden ( $p = 0,7549$ ). In dieser Analyse lag ebenfalls keine signifikante Wirkung der Lagerungstemperaturen vor.

Die beiden unterschiedlichen Lagerungstemperaturen hatten in der zweifaktoriellen Varianzanalyse auf den Anteil schnell beweglicher Samenzellen in den Nativejakulaten einen signifikanten Einfluss ( $p =$

0,0413). Bei allen anderen untersuchten Bewegungsparametern konnte dieser Einfluss nicht nachgewiesen werden. Bei dem zusätzlich durchgeführten generalisierten linearen Modell bestand keine signifikante Wirkung des Einflussfaktors Temperatur auf den Anteil der schnell beweglichen Samenzellen ( $p = 0,5521$ ). In diesem statistischen Auswertungsverfahren hatte die Lagerungstemperatur auf die anderen untersuchten Motilitätsparameter ebenfalls keine signifikante Wirkung.

Die kombinierte Wechselwirkung der beiden Faktoren Lagerungstemperatur und Untersuchungszeitpunkt zeigte einen statistisch signifikanten Einfluss auf den Anteil der kreisbeweglichen Spermien ( $p = 0,0003$ ). Dieser signifikante Interaktionseffekt auf den Anteil der kreisbeweglichen Samenzellen wurde auch durch das generalisierte lineare Modell bestätigt ( $p = 0,0077$ ). Bei den anderen Motilitätsparametern zeigte sich auch durch die Kombination der variablen Faktoren kein signifikanter Einfluss in beiden statistischen Auswertungsverfahren.

Die vor dem Einfrieren verwendeten Lagerungstemperaturen hatten in der multifaktoriellen Varianzanalyse einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Anzahl an lebenden und toten Samenzellen in den aufgetauten Proben ( $p = 0,0105$ ). In dem zusätzlich durchgeführten generalisierten linearen Modell konnte ebenfalls ein genereller Einfluss der Lagerungstemperatur auf das Lebend–Tot–Verhältnis der Spermien bestätigt werden ( $p = 0,0244$ ).

Außerdem hatte die Kombination der drei variablen Faktoren Lagerungstemperatur, Untersuchungszeit und Verdünnungszeitpunkt in der mehrfaktoriellen Varianzanalyse einen signifikanten Einfluss auf das Lebend–Tot–Verhältnis der Samenzellen ( $p = 0,0403$ ). Dieser signifikante Interaktionseffekt war im zusätzlich durchgeführten statistischen Auswertungsverfahren mit Berücksichtigung der hierarchischen Struktur nicht ausreichend hoch ( $p = 0,3259$ ).

Ein signifikanter Einfluss der beiden Lagerungstemperaturen konnte in der mehrfaktoriellen Varianzanalyse auf die Gesamtmotilität, die

Vorwärtsbeweglichkeit und die unbeweglichen Spermien nachgewiesen werden ( $p = 0,0289$  für alle drei Parameter). Das generalisierte lineare Modell bestätigte diesen generellen Einfluss der Lagerungstemperatur auf die drei genannten Motilitätsparameter ( $p = 0,0053$  für alle drei Parameter).

In der mehrfaktoriellen Varianzanalyse wurde eine statistisch signifikante Wirkung der Lagerungstemperatur während der spermatologischen Untersuchung vor dem Einfrieren auf die schnell ( $p = 0,0190$ ) und langsam ( $p = 0,0479$ ) beweglichen Samenzellen erreicht. Bei der statistischen Auswertung mit Hilfe des generalisierten linearen Modells konnte dieser generelle Einfluss auf die schnellen ( $p = 0,0061$ ) und langsamen ( $p=0,0150$ ) Spermien bestätigt werden. Für den Anteil der kreisbeweglichen Spermien in den aufgetauten Proben konnte ein statistisch signifikanter Einfluss der kombinierten Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Verdünnungszeitpunkt lediglich in der mehrfaktoriellen Varianzanalyse erreicht werden ( $p = 0,0259$ ).

#### **4.5.1 Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach der Gewinnung und dem Auftauen auf die Motilitätsparameter und das Lebend-Tot-Verhältnis der Samenzellen**

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte ein statistisch signifikanter Einfluss des Untersuchungszeitpunktes auf das Verhältnis der lebenden und toten Samenzellen in den Nativejakulaten nachgewiesen werden ( $p < 0,0001$ ). Bei der zusätzlichen statistischen Analyse mit dem generalisierten linearen Modell und anschließendem Wald-Test war der Einfluss ebenfalls ausreichend hoch um eine signifikante Wirkung zu erzielen ( $p < 0,0001$ ). Die Anzahl der lebenden Samenzellen nahm generell mit einer zunehmenden Untersuchungsdauer ab.

Für die Motilitätsparameter Gesamtbeweglichkeit, vorwärts- und unbewegliche Spermien wurde in der Varianzanalyse ein signifikanter Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nachgewiesen ( $p = 0,0012$  für alle

drei Parameter). In dem statistischen Analyseverfahren mit Berücksichtigung der hierarchischen Zugehörigkeit der Proben zu einem bestimmten Ziegenbock war dieser Effekt nicht ausreichend hoch um das festgesetzte Signifikanzniveau zu erreichen ( $p = 0,5492$  für die Gesamtbeweglichkeit und die vorwärtsbeweglichen Spermien und  $p = 0,5493$  für die unbeweglichen Spermien).

Der variable Faktor Zeit hatte nur in der zweifaktoriellen Varianzanalyse auf den Anteil der schnell beweglichen Samenzellen einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,0001$ ).

Für die untersuchten Nativproben konnte bei beiden angewendeten statistischen Auswertungsverfahren keine ausreichende Wirkung des Untersuchungszeitpunktes auf den Anteil kreis- ( $p = 0,700$  und  $p = 0,6713$ ) und langsam ( $p = 0,6932$  und  $p = 0,7954$ ) beweglicher Samenzellen nachgewiesen werden.

Wie unter 4.5. beschrieben zeigte die kombinierte Wechselwirkung der Parameter Zeit und Lagerungstemperatur einen signifikanten Einfluss auf den Anteil der kreisbeweglichen Spermien in den Nativejakulaten sowohl in der zweifaktoriellen Varianzanalyse ( $p = 0,0003$ ) als auch bei dem generalisierten linearen Modell mit anschließendem Wald-Test ( $p = 0,0077$ ).

Nach dem Auftauen der Proben hatte der Untersuchungszeitpunkt in der mehrfaktoriellen Varianzanalyse einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Verhältnis der lebenden und toten Samenzellen ( $p = 0,0022$ ). Bei der Berücksichtigung der hierarchischen Struktur und Analyse mit dem Wald-Test war der Effekt nicht ausreichend hoch um das Signifikanzniveau zu erreichen ( $p = 0,2305$ ).

Die kombinierte Wechselwirkung der drei untersuchten Einflussfaktoren zeigte in der mehrfaktoriellen Varianzanalyse einen signifikanten Einfluss auf das Lebend-Tot-Verhältnis der Spermien ( $p = 0,0403$ ). Dieser Interaktionseffekt konnte durch den zusätzlich durchgeführten Wald-Test nicht bestätigt werden ( $p = 0,3259$ ).

In der mehrfaktoriellen Varianzanalyse konnte in den aufgetauten Samenproben ein signifikanter Einfluss des Untersuchungszeitpunktes auf die Gesamtbeweglichkeit ebenso wie auf die vorwärts- und unbeweglichen Samenzellen nachgewiesen werden ( $p = 0,00008$  für alle drei Parameter). Die schnell ( $p = 0,0026$ ) und langsam ( $p = 0,0041$ ) beweglichen Spermien wurden ebenfalls statistisch signifikant durch den Untersuchungszeitpunkt beeinflusst. Diese bedeutenden Einflüsse wurden mithilfe des generalisierten linearen Modells und anschließendem Wald-Test nicht bestätigt.

Die Kombination der Faktoren Verdünnungszeitpunkt und Untersuchungszeitpunkt ergab nur in der zweifaktoriellen Varianzanalyse einen signifikanten Einfluss auf die kreisbeweglichen Samenzellen ( $p = 0,0259$ ).

Zusammenfassend liegt nur für den Anteil an lebenden und toten Samenzellen in den Nativejakulaten in beiden angewendeten statistischen Auswertungsverfahren ein statistisch signifikanter Einfluss des Untersuchungszeitpunktes vor.

#### **4.5.2 Einfluss des Verdünnungszeitpunkts auf die progressive Motilität, das Lebend-Tot-Verhältnis und die Anzahl morphologisch veränderter Samenzellen**

Die beiden unterschiedlichen Verdünnungszeitpunkte zeigten sowohl in der mehrfaktoriellen Varianzanalyse ( $p = 0,2540$ ) als auch bei dem generalisierten linearen Modell mit anschließendem Wald-Test ( $p = 0,4039$ ) keinen ausreichenden Einfluss auf das Verhältnis der lebenden und toten Samenzellen in den aufgetauten Samenproben um das vorgegebene Signifikanzniveau zu erreichen.

Für die untersuchten aufgetauten Proben konnte weder in der Varianzanalyse ( $p = 0,1397$ ) noch mit Hilfe des generalisierten linearen Modells ( $p = 0,2324$ ) ein signifikanter Einfluss des

Verdünnungszeitpunktes auf den Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen nachgewiesen werden.

Für die Gesamtzahl morphologisch veränderter Samenzellen ( $p = 0,357$  und  $p = 0,361$ ) und für die Kopf- und Kappenveränderungen ( $p = 0,735$  in beiden statistischen Verfahren) der Spermien konnte bei beiden durchgeführten statistischen Auswertungsverfahren kein bedeutender Einfluss des Verdünnungszeitpunktes nachgewiesen werden. Ein statistisch signifikanter Einfluss des Verdünnungszeitpunktes vor dem Einfrierprozess der Samenzellen wurde auf die Anzahl der losen Köpfe mit Hilfe der Poisson-Regression für gemischte hierarchische Modelle mit anschließendem Wald-Test nachgewiesen ( $p = 0,00126$ ). Dies konnte auch in dem zusätzlich durchgeführten Test mit Berücksichtigung der hierarchischen Struktur der Proben bestätigt werden ( $p = 0,00155$ ). Die pathologischen Veränderungen am Spermienschwanz wurden ebenfalls durch den Zeitpunkt der Verdünnung signifikant beeinflusst ( $p = 0,0466$ ). Für beide statistischen Auswertungsverfahren lag derselbe p-Wert vor. Der Poisson-Wald-Test ohne Berücksichtigung der hierarchischen Zugehörigkeit der Proben bestätigte einen signifikanten Einfluss des Verdünnungszeitpunktes auf die Anzahl an Spermien mit einem Plasmotropfen ( $p = 0,0332$ ). In der zweiten Analyse mit Berücksichtigung der Zugehörigkeit der Proben zu einem bestimmten Ziegenbock konnte der gleiche p-Wert ( $p = 0,0332$ ) errechnet werden.

Zusammenfassend hatten die beiden Verdünnungszeitpunkte weder einen signifikanten Einfluss auf die Vitalität noch auf die Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen nach dem Auftauen der Proben.

Auf bestimmte morphologische Veränderungen der Spermien scheint der Verdünnungszeitpunkt vor dem Einfrierprozess einen Einfluss zu haben.

#### **4.5.3 Zusammenhang zwischen dem pH-Wert des Spermas und der Untersuchungsdauer sowie der unterschiedlichen Lagerungstemperaturen**

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde ein statistisch signifikanter Einfluss der Lagerungstemperatur auf den pH-Wert des Spermas festgestellt ( $p = 0,0020$ ). Die Überprüfung des Ergebnisses erfolgte mit Hilfe des generalisierten linearen Modells mit anschließendem Wald-Test. Bei diesem Analyseverfahren war der Einfluss der Lagerungstemperatur auf den pH-Wert nicht ausreichend hoch um das vorgegebene Signifikanzniveau zu erreichen ( $p = 1,0000$ ).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Untersuchungszeitpunktes auf den pH-Wert des Spermas ( $p < 0,0001$ ). Dieser Effekt konnte durch das zusätzliche generalisierte lineare Modell mit anschließendem Wald-Test nachvollzogen werden ( $p < 0,0001$ ).

Eine signifikante Wechselwirkung der beiden untersuchten Faktoren auf den pH-Wert lag in der zweifaktoriellen Varianzanalyse vor ( $p < 0,0001$ ). Dieser Interaktionseffekt konnte durch das generalisierte lineare Modell bestätigt werden ( $p = 0,0089$ ).

Es scheint somit eine wirkliche Abhängigkeit zwischen den beiden untersuchten Faktoren vorzuliegen, da dieser Effekt durch beide angewandten statistischen Auswertungsverfahren bestätigt wurde. Trotz tendenzieller Beobachtungen konnte kein genereller statistisch signifikanter Einfluss der Lagerungstemperatur auf den pH-Wert des Ejakulates durch beide Auswertungsverfahren bestätigt werden. Allerdings scheint der Untersuchungszeitpunkt einen entscheidenden Einfluss auf den pH-Wert des Spermas zu haben.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Fragestellung**

Die spermatologische Untersuchung spielt im Rahmen der Zuchttauglichkeitsuntersuchung, bei Verdacht auf eine Infertilität und der Besamung eine entscheidende Rolle.

In der Literatur sind verschiedene Verdünner und Einfrierprotokolle für die Samenkonservierung beschrieben. Bisher fehlt allerdings ein Standardprotokoll für die Untersuchung und Kryokonservierung capriner Spermien.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der Faktoren Lagerungstemperatur und Untersuchungszeitpunkt auf das Ergebnis der spermatologischen Untersuchung von nativen und aufgetauten gefrierkonservierten Proben zu evaluieren.

In der Regel werden die Samenzellen von Ziegen während der spermatologischen Untersuchung in einem Temperaturbereich von 37°C gelagert (Bopape et al. 2015; Choe et al. 2006; Kozdrowski et al. 2007; Naing et al. 2011; Pérez und Mateos 1996; Ramukhithi et al. 2011; Roof et al. 2012; Sultana et al. 2013; Tuli und Holtz 1995). Um den Einfluss der Temperatur zu evaluieren wurde zum Vergleich eine Lagerungstemperatur von 20°C gewählt, die einer standardisierten Raumtemperatur entsprechen soll.

Die Untersuchungszeitpunkte nach der Samengewinnung sind in der Literatur sehr variabel angegeben. Allgemein sollte die spermatologische Untersuchung direkt im Anschluss an die Gewinnung erfolgen. Nach Busch und Fischer (2007) muss das gewonnene Ejakulat von Ziegenböcken innerhalb von 10 Minuten nach der Gewinnung untersucht werden, ohne anzugeben, ab welchem Zeitpunkt Veränderungen in den spermatologischen Parametern auftreten. Für diese Arbeit wurden die Nativejakulate bis zu einem Zeitraum von 30 Minuten analysiert.



Als weiterer Einflussfaktor auf die Qualität der gefrierkonservierten Samenproben wurden zwei unterschiedliche Verdünnungszeitpunkte für die Vorbereitung zur Kryokonservierung gewählt.

Alle Proben wurden in einem Wasserbad von 37°C für 20 Sekunden aufgetaut. In manchen Studien wurde die aufgetaute Samenprobe nicht sofort untersucht sondern zunächst für 2 - 3 Minuten (Aboagla und Terada 2004; Tuli und Holtz 1995) oder 5 Minuten im Wasserbad gelagert (Jiménez-Rabadán et al. 2012). Karger et al. (2014) untersuchten die Vorwärtsbeweglichkeit von gefrierkonserviertem Hundesperma nach dem Auftauen zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 5, 20 und 60 Minuten). Fünf Minuten nach dem Auftauen waren die Ergebnisse für die Vorwärtsbeweglichkeit am höchsten. Ähnliche Untersuchungen zu Ziegensperma fehlen.

Im eigenen Versuchsaufbau sollte der Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen der Proben auf die Samenqualität von caprinem Sperma in einem Zeitraum von 3 - 10 Minuten untersucht werden. Im Vordergrund standen dabei die Vorwärtsbeweglichkeit und die Vitalität der Samenzellen, da beide Parameter zu den wichtigsten Kenngrößen einer Samenprobe gehören.

## **5.2 Diskussion der Methodik**

### **5.2.1 Auswahl der Probanden**

Die für die Untersuchungen verwendeten Ejakulate wurden von fünf Pfauenziegenböcken gewonnen. Die Böcke, zu Beginn der Versuche alle in einem Alter von neun Monaten, waren bisher nicht im Zuchteinsatz. Alle Tiere waren klinisch gesund und zeigten keine Veränderungen ihrer Geschlechtsorgane.

Der Beginn der Pubertät bei kleinen Wiederkäuern steht in Verbindung mit dem Alter und dem Körpergewicht der Tiere (Ridler et al. 2012). Die Spermatogenese beginnt bei Schaf- und Ziegenböcken in einem Alter von

5 Monaten (Weitze 2001). Nach Busch und Fischer (2007) sollte das Training der Jungböcke in einem Alter von 6 - 8 Monaten beginnen und bis zum 12. Lebensmonat fortgesetzt werden. Ridler et al. (2012) beschreiben, dass die Tiere für die Zucht genutzt werden können, sobald sie die Pubertät erreicht haben. Allerdings sei es bei saisonalen Rassen üblich, bis zur nächsten Zuchtsaison zu warten, damit die Tiere ein Alter von 17 - 19 Monaten erreicht haben (Ridler et al. 2012). Nach Weitze (2001) werden in der ersten Fortpflanzungssaison 60% der endgültigen Hodenleistung erreicht. Al-Ghalban et al. (2004) bestätigten, dass sowohl das Alter der Böcke als auch die Jahreszeit einen deutlichen Einfluss auf die Samenqualität haben. Die Ziegenböcke zwischen 2 - 4 Jahren hatten ein größeres Ejakulatvolumen, eine höhere Spermienkonzentration und weniger morphologisch veränderte Samenzellen im Vergleich zu den jüngeren Böcken zwischen 10 und 12 Monaten (Al-Ghalban et al. 2004).

Das Alter der Ziegenböcke in dieser Arbeit könnte folglich einen Einfluss auf die Qualität der gewonnenen Ejakulate haben. Die Qualität stand jedoch nicht im Interesse der Untersuchungen. Die Ziegenrasse, ebenso wie der individuelle Bock, kann die Samenqualität ebenfalls beeinflussen. Karagiannidis et al. (2000) untersuchten die Samenparameter und saisonalen Veränderungen bei Alpinen Ziegen, Saanen Ziegen und Damaskus Ziegen, die in Griechenland aufgewachsen sind. Sowohl die Rasse als auch der individuelle Bock hatten einen signifikanten Einfluss auf die Samenparameter (Karagiannidis et al. 2000).

### **5.2.2 Probengewinnung**

Das Training der Böcke hat in einem Alter von sieben Monaten begonnen. Nach zweimonatiger Trainingsphase startete die eigentliche Entnahme von Ejakulaten für die Untersuchungen. Die Gewinnung der Ejakulate erfolgte mithilfe einer speziell für Schafe und Ziegen konzipierten künstlichen Vagina. Insgesamt wurden 20 Ejakulate für die Untersuchungen verwendet. Um umweltbedingte Einflüsse auszuschließen, fand die Samenentnahme immer unter den gleichen

Bedingungen statt. Aufgrund einer individuell variierenden Deckbereitschaft der Ziegenböcke, konnten im Zeitraum der Probengewinnungen nicht von allen Tieren eine einheitliche Anzahl an Ejakulaten gewonnen werden. Für die Untersuchungen wurden nur Ejakulate mit einem Volumen von mindestens 0,3 ml genutzt, da die weitere Versuchsdurchführung mit zwei Temperaturansätzen, mehreren Untersuchungszeitpunkten und der anschließenden Kryokonservierung mit einem geringeren Volumen nicht möglich gewesen wäre.

Die verwendeten Ejakulate für die Untersuchungen und die Gefrierkonservierung entsprachen nicht alle den Mindestanforderungen nach Busch und Fischer (2007), die an Ziegensperma gestellt werden. Davon waren fünf von insgesamt zwanzig gewonnenen Ejakulaten betroffen. Drei von fünf Böcken erfüllten bei jeder Gewinnung die Mindestanforderungen. Bock Nr. 4 hatte bei drei von vier Ejakulaten eine zu geringe Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen und einmalig eine verminderte Spermienkonzentration. Bei Bock Nr. 5 war die Anzahl der vorwärtsbeweglichen Samenzellen bei zwei von fünf Proben erniedrigt. Die Ergebnisse in dieser Studie sollen dazu beitragen, die spermatologische Untersuchung von Ziegensperma zu standardisieren. Dabei ist die Erfüllung der Mindestanforderungen an natives Ziegensperma nicht erforderlich. Deshalb wurden für diesen Versuchsaufbau auch Ejakulate verwendet, die nicht den Mindestanforderungen entsprachen.

Ziegen haben eine saisonal abhängige Fortpflanzungsperiode (Fatet et al. 2011). Dabei spielt vor allem die Tageslichtlänge eine entscheidende Rolle (Fatet et al. 2011). Tuli und Holz (1995) untersuchten den saisonalen Einfluss auf die Gefriertauglichkeit von Burenziegensperma. Die Probengewinnung fand im Laufe eines Jahres statt und die Böcke wurden alle in Deutschland gehalten. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen ebenso wie die Anzahl lebender Spermien sowohl vor als auch nach dem Einfrieren durch die Jahreszeit beeinflusst werden (Tuli und Holz 1995). Die besten Ergebnisse wurden im Zeitraum September bis März gewonnen und davon insbesondere im

Februar (Tuli und Hilz 1995). Auch bei Karagiannidis et al. (2000) erreichten die Ziegenböcke während der Fortpflanzungssaison die beste Samenqualität.

Die Absamungen fanden in einem Zeitraum von Januar bis April 2015 statt. Ein saisonaler Einfluss auf die Paarungsbereitschaft und die Samenqualität der Böcke kann daher nicht ausgeschlossen werden. Dieser ist jedoch für die Fragestellung in dieser Arbeit unerheblich.

### **5.2.3 Untersuchungsmethoden**

Für die Untersuchung der gewonnenen Ejakulate wurde eine Kombination aus klassischer Spermatologie und computerassistierter Samenanalyse gewählt. Aufgrund einer zu hohen Dichte mussten alle Ejakulate vor den Untersuchungen mit dem CASA-System verdünnt werden. Dies erfolgte nach den Empfehlungen der Fa. Minitüb (Tiefenbach) für Untersuchungen von Bullensperma in einem Verhältnis Sperma zu Verdünner von 1 : 29.

Insbesondere die Beurteilung der Motilität von Samenzellen im Rahmen der klassischen Samenuntersuchung ist eine subjektive Methode und abhängig von den Erfahrungen der untersuchenden Person. Um große Varianzen in den Messergebnissen auszuschließen wurden die Motilitätsparameter in diesen Versuchen mit dem AndroVision®-System bestimmt. Die CASA-Untersuchungen bieten eine objektive Beurteilung der Bewegungsparameter (Verstegen et al. 2002).

Ein Nachteil des AndroVision®-Systems für diesen Versuchsaufbau war die Temperatur des Objektisches vom angeschlossenen Mikroskop. Diese lag bei 38°C für alle durchgeführten Messungen. Die Proben aus dem Versuchsansatz 20°C wurden bis zur Analyse im Wasserbad gelagert, sodass sie nur für Sekunden auf dem warmen Objektisch lagen. Es ist nachgewiesen, dass die Temperatur die Motilität der Samenzellen beeinflusst (Verstegen et al. 2002). Ein möglicher Einfluss des angewärmten Objektisches auf die Bewegungsparameter der Samenzellen kann hier nicht ausgeschlossen werden, allerdings lagen für

alle Untersuchungen die gleichen Temperaturbedingungen des Objektisches vor.

Die genaue Bestimmung der Spermienkonzentration mit Hilfe des CASA-Systems stellt bei allen Tierarten ein Problem dar, da generell die Dichte höher geschätzt wird im Vergleich zur manuellen Untersuchung mittels Zählkammer (Verstegen et al. 2002). Eine mögliche Erklärung ist die mehrfache Untersuchung desselben individuellen Spermiums durch das System (Verstegen et al. 2002). Generell neigt das CASA-System zu einer Überschätzung der Spermiedichte von Nativejakulaten und unterschätzt die Konzentration des gefrierkonservierten Spermas, möglicherweise bedingt durch die variierende Agglutination der Spermien nach dem Auftauen (Verstegen et al. 2002). Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurde in dieser Arbeit die Dichte von allen Ejakulaten mit dem AndroVision®-System gemessen.

Die Bestimmung des Anteils der lebenden und toten ebenso wie die Auswertung der morphologisch veränderten Samenzellen erfolgte mithilfe der Färbelösung Bromphenol-Nigrosin. Diese Färbemethode ist bisher in der Literatur wenig beschrieben im Vergleich zur häufiger verwendeten Eosin-Nigrosin-Färbung. Bromphenol-Nigrosin wurde bei Schafböcken bereits angewendet für die Vitalitätsbestimmung und zur Untersuchung der Morphologie der Samenzellen (Pogorzelski 2006). Oliveira et al. (2013) beschreiben in ihrer Studie unter anderem die Verwendung des Farbstoffs Bromphenol zur Beurteilung des Anteils lebender Samenzellen und der Pathomorphologie bei Ziegen.

In dieser Arbeit wurde die Färbelösung Bromphenol-Nigrosin verwendet aufgrund der einfachen Anwendung, dem guten farblichen Kontrast der Spermien und der Möglichkeit eine Färbelösung für die Beurteilung des Lebend-Tot-Verhältnisses und der Morphologie der Spermien zu nutzen.

Für beide Untersuchungen wurden jeweils 200 Spermien ausgezählt.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Einfluss der verschiedenen Lagerungstemperaturen**

Die Motilität der Samenzellen ist einer der wichtigen Parameter, die einen Rückschluss auf die Fertilität eines männlichen Tieres geben (Kathiravan et al. 2011). Nach Verstegen et al. (2002) beeinflusst die Temperatur wesentlich die Motilität der Spermien. In einer Studie waren bei Hunden die untersuchten Bewegungsparameter bei einer Temperatur von 30 Grad deutlich niedriger im Vergleich zu 37 Grad (Verstegen et al. 2002). Hoffmann (2003) empfiehlt die Beweglichkeit der Spermien bei isothermen Bedingungen von 36 - 38°C zu beurteilen, ebenso wie Tuli und Holz (1995). Verstegen et al. (2002) schlägt eine Temperatur nahe der Körpertemperatur zur Motilitätsbeurteilung vor.

Diese Empfehlungen scheinen nach den Ergebnissen in dieser Arbeit auf das native Sperma von Ziegenböcken nicht zuzutreffen. Nach der Beurteilung der Messergebnisse des CASA-Systems von den Nativejakulaten war die Einzelbeweglichkeit der Samenzellen bei einer Lagerungstemperatur von 20 Grad besser. Leider konnten diese Beobachtungen statistisch nicht bestätigt werden. Lediglich in der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde ein signifikanter Einfluss der Temperatur auf den Anteil der schnell beweglichen Spermien bestimmt. Es bleibt fraglich, ob es sich hierbei um einen Zufallsbefund handelt, da der signifikante Effekt mithilfe des zweiten statistischen Auswertungsverfahrens nicht bestätigt werden konnte.

Durch die computerassistierte Samenanalyse können neben den klassischen Bewegungsparametern, wie der Vorwärtsbeweglichkeit, weitere Bewegungsmuster der Spermien beurteilt werden. In den Nativejakulaten erreichte der Interaktionseffekt zwischen der Lagerungstemperatur und dem Untersuchungszeitpunkt einen ausreichend hohen Effekt auf die kreisbeweglichen Samenzellen in beiden statistischen Auswertungsverfahren um das Signifikanzniveau zu erreichen. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien findet von allen Bewegungsparametern in der Literatur am meisten Beachtung. Bisher

liegen kaum Untersuchungen über den Einfluss auf den Anteil kreisbeweglicher Samenzellen vor. Nach Pezzanite et al. (2010) gehören die kreisbeweglichen Spermien zur Kategorie der unbeweglichen Samenzellen. Waberski und Petrunkina (2007) zählen Spermien mit Kreisbewegung, sofern der Kreis maximal dem der Spermienkopflänge entspricht, zu den ortsbeweglichen Samenzellen. Als mögliche Ursachen für die Kreisbewegung von Spermien kommen pathologische Schwanzveränderungen, sowie osmotische Veränderungen, die zu einer Aufrollung der Geißel führen können, in Frage.

Die Qualität der aufgetauten Proben wurde durch die vorherige Lagerungstemperatur entscheidend beeinflusst. Um die Qualität von kryokonserviertem Ziegensperma zu verbessern, sollte nach den Ergebnissen in dieser Arbeit eine Untersuchungstemperatur unter 37 Grad bevorzugt werden. Ob die hier gewählte Lagerungstemperatur von 20 Grad den optimalen Untersuchungsbedingungen entspricht oder möglicherweise eher eine Temperatur zwischen 25 - 30 Grad sollte in weiteren Versuchen evaluiert werden. Lediglich die kreisbeweglichen Spermien in den aufgetauten Portionen wurden nicht entscheidend durch die vorherige Lagerungstemperatur beeinflusst. Nach dem Auftauen der Proben sind alle Motilitätsparameter mit Ausnahme der unbeweglichen Spermien gesunken. Die Kreisbewegung von Spermien scheint eine unabhängige Eigenschaft der Samenzellen zu sein und keine Entwicklungsstufe von vorwärtsbeweglichen zu unbeweglichen Spermien. Sonst hätte der Anteil an kreisbeweglichen Samenzellen nach dem Auftauen höher sein müssen im Vergleich zu den Nativejakulaten. Eine weitere mögliche Erklärung für den fehlenden Einfluss der Lagerungstemperatur auf den Anteil kreisbeweglicher Spermien stellen pathologische Schwanzveränderungen, wie zum Beispiel ein abaxialer Schwanzansatz, dar. Solche morphologischen Veränderungen werden durch exogene Einflussfaktoren nicht verändert.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Anzahl lebender und toter Samenzellen untersucht. In den Nativejakulaten konnte kein entscheidender Einfluss nachgewiesen werden.

Auf den Anteil lebender Spermien in den aufgetauten Proben hat die vorherige Lagerungstemperatur während der spermatologischen Untersuchung hingegen einen bedeutenden Einfluss. Die Ergebnisse zeigten eine höhere Anzahl lebender Samenzellen bei einer vorherigen Lagerungstemperatur von 20 Grad. Durch beide statistischen Auswertungsverfahren konnte ein genereller Einfluss der Temperatur auf den Anteil lebender Spermien durch das Erreichen des Signifikanzniveaus bestätigt werden. Somit ist genau wie bei den Motilitätsparametern eine vorherige Lagerungstemperatur unter 37 Grad empfehlenswerter um eine bessere Qualität der aufgetauten gefrierkonservierten Proben zu erreichen.

Zusammenfassend hat nach den Untersuchungen in dieser Arbeit die Lagerungstemperatur vor der Untersuchung einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der spermatologischen Untersuchung von gefrierkonserviertem Sperma bei Ziegen. Dies konnte statistisch bestätigt werden. Busch und Fischer (2007) empfehlen 32 Grad als Aufbewahrungstemperatur für das gewonnene Ejakulat von Ziegen oder Schafen. Ob dieser Temperaturbereich dem optimalen Milieu entspricht oder niedrigere Temperaturen um 20 Grad sollte in weiteren Untersuchungen evaluiert werden.

Für Bullensperma empfehlen Busch und Fischer (2007) ebenfalls eine Aufbewahrungstemperatur von 32 Grad. Allerdings sollten zur Beurteilung der funktionellen Parameter alle Gerätschaften auf 37 Grad vorgewärmt werden (Busch und Fischer 2007). Der Heiztisch des Mikroskops für die computerassistierte Samenanalyse war für alle Versuche auf 38 Grad vorgewärmt, so dass auch das Sperma mit einer niedrigeren Lagerungstemperatur für Sekunden diesem Temperaturbereich während der Motilitätsanalyse ausgesetzt war. Es ist somit zu vermuten, dass die Beweglichkeit der Spermien durch die Temperaturerhöhung anstieg.

Nach Busch und Fischer (2007) kann das unverdünnte Sperma von kleinen Wiederkäuern nach einer Lagerung bei 30 Grad auch noch innerhalb von 20 - 30 Minuten nach der Gewinnung verwendet werden. Diese Aussage ist vergleichbar mit den Ergebnissen in dieser Arbeit. Bei



einer Lagerungstemperatur von 20 Grad entsprachen die gewonnenen Ejakulate im Durchschnitt immer noch den Mindestanforderungen, die an natives Ziegensperma gestellt werden. Die Ejakulate, die bei 37 Grad gelagert wurden, lagen knapp unterhalb der Mindestanforderungen.

### **5.3.2 Einfluss der verschiedenen Untersuchungszeiten vor und nach dem Einfrieren**

Über den Untersuchungszeitpunkt des Spermas nach der Gewinnung gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Nach Busch und Fischer (2007) muss das gewonnene Ejakulat innerhalb von 10 Minuten nach der Gewinnung untersucht werden. In der Regel erfolgt die Samenuntersuchung direkt im Anschluss an die Gewinnung (Pérez und Mateos 1996; Roof et al. 2012). In anderen Studien lagen die Zeitangaben zwischen 2 - 3 Minuten (Tuli und Holtz 1995), nach 20 Minuten (Sariözkán et al. 2010) oder innerhalb einer Stunde nach der Entnahme (Bopape et al. 2015; Choe et al. 2006; Gacitua und Arav 2005).

Der Anteil lebender Samenzellen nimmt mit einer zunehmenden Untersuchungsdauer ab. Daher sollte dieser Parameter generell so schnell wie möglich nach der Samengewinnung oder dem Auftauen der konservierten Proben bestimmt werden. Durch beide hier angewendeten statistischen Auswertungsverfahren konnten diese Beobachtungen durch das Erreichen des vorgegebenen Signifikanzniveaus für die Nativejakulate bestätigt werden. Für die aufgetauten Proben wurden diese Beobachtungen mithilfe der multifaktoriellen Varianzanalyse bestätigt.

Für die Motilitätsparameter wurde eine ähnliche Tendenz in den Nativejakulaten beobachtet. Allerdings konnten diese Beobachtungen statistisch nicht durch beide Auswertungsverfahren belegt werden. Lediglich in der zweifaktoriellen Varianzanalyse lag ein signifikanter Einfluss des Untersuchungszeitpunktes auf die Gesamtbeweglichkeit und den Anteil vorwärts-, schnell- und unbeweglicher Spermien vor.

Wie unter 5.3.1 beschrieben wird der signifikante Einfluss durch die kombinierte Wechselwirkung der Faktoren Untersuchungszeit und Lagerungstemperatur auf die kreisbeweglichen Spermien vernachlässigt.

Karger et al. (2014) untersuchten die Vorwärtsbeweglichkeit caniner Spermien nach dem Auftauen zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien war signifikant am höchsten zum Untersuchungszeitpunkt 5 Minuten nach dem Auftauen. In anderen Studien wurden die Spermienproben von Ziegen nach 2 - 3 Minuten (Aboagla und Terada 2004; Tuli und Holtz 1995) oder 5 Minuten (Jiménez-Rabadán et al. 2012) nach dem Auftauen untersucht.

In dieser Arbeit war der Anteil progressiv beweglicher Spermien im Durchschnitt am höchsten zum Untersuchungszeitpunkt 10 Minuten nach dem Auftauen. Eine Ausnahme stellen die Ejakulate dar, die vor dem Einfrieren bei 20°C gelagert und nach 15 Minuten verdünnt wurden. Bei diesen Proben war die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien 5 Minuten nach dem Auftauen am höchsten. Eine kurzzeitige Adaptierung des gefrierkonservierten Spermas an die Wasserbadtemperatur von 37°C scheint folglich einen positiven Einfluss auf die Motilität der Spermien zu haben. Durch die warme Temperatur wird der Stoffwechsel der Samenzellen angeregt. Dennoch war dieser Einfluss nicht ausreichend hoch, um das vorgegebene Signifikanzniveau zu erreichen.

Als optimaler Untersuchungszeitpunkt um die Motilität und Vitalität der Spermien nach dem Auftauen zu bestimmen scheint ein Kompromiss wie der Untersuchungszeitpunkt 5 Minuten nach dem Auftauen am sinnvollsten zu sein.

### **5.3.3 Einfluss der unterschiedlichen Verdünnungszeitpunkte**

Um das Überleben der Spermien *in vitro* zu verlängern und zur Vorbereitung auf den Einfrierprozess müssen sie mit einem speziellen Verdünner gemischt werden. Generell gibt es keinen festgelegten Zeitpunkt für die Zugabe dieses Verdünners für Ziegensperma. In der

Regel erfolgt die Verdünnung direkt im Anschluss an die Spermauntersuchung. Je nach Verdünnungssystem sind dafür ein oder mehrere Schritte notwendig. Für die Zugabe der weiteren Verdünnungskomponenten liegt dann ein definierter Zeitpunkt nach einer bestimmten Lagerungstemperatur vor.

In dieser Arbeit wurde ein Verdünner ohne Zusatz tierischer Fremdproteine gewählt (Andromed®-Verdünner, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Dieser kommerziell erhältliche Verdünner für Bullensperma beinhaltet synthetisch erzeugte Lecithin-Komponenten. Die Verdünnung des Spermas erfolgte in einem Schritt. Es ist nachgewiesen, dass Ziegensperma gegenüber den herkömmlichen Verdünnern auf Eigelb- oder Magermilch-Basis Inkompatibilitäten zeigt (Barbas und Mascarenhas 2009; Busch und Fischer 2007; Choe et al. 2006; Cseh et al. 2012; Jimenéz-Rabadán et al. 2012; Leboeuf et al. 2000; Sariözkán et al. 2010). Unter anderem wiesen Chelucci et al. (2015) in ihrer Studie nach, dass sich Verdünner auf Basis von Sojabohnen-Lecithin für die Kryokonservierung von Ziegensperma besser als Verdünner auf Eigelb-Basis eignen. Der Andromed®-Verdünner wurde bisher in einigen Studien erfolgreich für die Gefrierkonservierung von Ziegensperma verwendet (Gacitua und Arav 2005; Janett et al. 2005; Jimenéz-Rabadán et al. 2012). Daher wurde der Verdünner in der vorliegenden Studie genutzt.

Die Ejakulate in dieser Arbeit wurden 15 und 30 Minuten nach der Gewinnung verdünnt. Tuli und Holz (1995) geben 20 Minuten nach der Gewinnung als Verdünnungszeitpunkt für das Sperma an. In ihrer Studie verwendeten sie einen Verdünner auf Tris- und Eigelbbasis. Die Verdünnung erfolgte in vier Schritten nach einem festgelegten Protokoll (Tuli und Holz 1995).

Ein signifikanter Einfluss des Verdünnungszeitpunktes auf die Anzahl lebender Samenzellen in den aufgetauten Proben konnte statistisch nicht belegt werden. Ebenso der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien wurde nicht entscheidend durch den Zeitpunkt der Verdünnung beeinflusst.

Auf bestimmte morphologische Veränderungen der Spermien hat der Verdünnungszeitpunkt vor dem Einfrierprozess jedoch einen bedeutsamen Einfluss. Dies gilt für die Anzahl loser Köpfe, die Schwanzveränderungen ebenso wie für die Anzahl Spermien mit einem Plasmotropfen.

Abgelöste Köpfe zählen zu den sekundären und tertiären morphologischen Veränderungen der Spermien. Die tertiären Veränderungen entstehen während oder nach der Samengewinnung (Waberski und Petrunkina 2007). Eine erhöhte Anzahl abgelöster Köpfe kann durch äußere Einflüsse verursacht werden und darf dann nicht zur Beurteilung der Ejakulatqualität des Tieres herangezogen werden (Waberski und Petrunkina 2007).

Das Vorhandensein der Plasmotropfen zählt zu den sekundären Spermienveränderungen, die während der Passage, Reifung und Lagerung im Nebenhoden entstehen (Waberski und Petrunkina 2007). Eine mögliche Ursache für das Haftenbleiben von Plasmotropfen kann eine zu hohe Deckfrequenz und damit eine verkürzte Reifungszeit der Spermien im Nebenhoden sein (Waberski und Petrunkina 2007). Der Abstand zwischen den Samengewinnungen in dieser Arbeit lag mindestens bei fünf Tagen. Dadurch kann eine zu hohe Deckfrequenz als Ursache ausgeschlossen werden. Als weitere mögliche Ursache kommen Störungen der Spermatogenese in Frage (Waberski und Petrunkina 2007). Der rechnerische Einfluss des Verdünnungszeitpunktes ist biologisch nicht erklärbar und sollte daher nicht überbewertet werden.

Schwanzformabweichungen wie Schleifen und Aufrollungen zählen ebenfalls zu den sekundären Veränderungen (Waberski und Petrunkina 2007). Die Zugabe des Verdünners verändert die osmotischen Bedingungen der Samenzellen. Möglicherweise haben diese Veränderungen bei einigen Spermien zu einer Aufrollung der Geißel geführt.

Von den fünf Böcken, die für diese Arbeit verwendet wurden, hebt sich ein Bock durch eine im Durchschnitt höhere Anzahl morphologischer

Veränderungen hervor. Dennoch lag der Anteil Spermien mit morphologischen Veränderungen bei allen fünf Böcken immer unter den Mindestanforderungen von Busch und Fischer (2007).

Für die Gesamtzahl morphologisch veränderter Samenzellen und für die Kopf- und Kappenveränderungen der Spermien konnte bei beiden durchgeführten statistischen Auswertungsverfahren kein bedeutender Einfluss des Verdünnungszeitpunktes nachgewiesen werden.

### **5.3.4 Einflussfaktoren auf den pH-Wert der Ejakulate**

Für die Samenqualität ist ein stabiler pH-Wert unerlässlich. Werden Werte unterhalb von 6,5 erreicht sind Motilität und Stoffwechsel der Spermien graduell reduziert (Weitze und Petrunkina 2007).

In dieser Arbeit konnte der pH-Wert der Nativejakulate insgesamt stabiler aufrechterhalten werden, wenn die Proben bei einer Temperatur von 20°C gelagert wurden. Bei beiden verwendeten Lagerungstemperaturen zeigte sich jedoch ein stetiger Abfall mit zunehmender Untersuchungsdauer. Bereits nach zehn Minuten konnte eine Absenkung des pH-Wertes in beiden Versuchsansätzen festgestellt werden, allerdings fielen die Werte bei 37°C schneller ab. Diese pH-Verschiebungen entstehen durch aerobe und anaerobe Stoffwechselprodukte der lebenden und absterbenden Samenzellen.

Diese tendenziellen Beobachtungen erreichten nur in der zweifaktoriellen Varianzanalyse einen signifikanten p-Wert. Bei der zusätzlichen Analyse mit Hilfe des generalisierten linearen Modells mit gemischten und hierarchisch gegliederten Effekten konnte dieser Effekt für beide variablen Faktoren nicht bestätigt werden. Daher bleibt die Frage offen, ob hier eine tatsächliche Signifikanz vorliegt oder lediglich ein Zufallsbefund. Es liegen individuelle Unterschiede zwischen den Ziegenböcken vor im Hinblick auf den pH-Wert des Spermas. Möglicherweise beeinflusst der individuelle Bock auch die Stabilität des pH-Wertes im Nativejakulat. Bei den einzelnen Ziegenböcken variiert der pH-Wert ebenso wie die Stabilität

zwischen den einzelnen Tieren. Entzündungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen können zu Veränderungen des pH-Wertes führen. Allerdings lagen bei den fünf Böcken in dieser Studie keine Hinweise darauf vor. Eine andere Erklärung für die geringen pH-Wert-Schwankungen zwischen den einzelnen Böcken ist die ungenaue Messmethode mit dem pH-Indikatorpapier.

Im Gegensatz dazu hatte der Untersuchungszeitpunkt einen deutlichen Einfluss auf den pH-Wert der Nativejakulate. Beide statistischen Auswertungsverfahren bestätigten diesen generellen Einfluss. Bei den späteren Untersuchungszeitpunkten konnte bei allen Ziegenböcken ein zunehmender Abfall des pH-Wertes beobachtet werden. Der Untersuchungszeitpunkt ist folglich entscheidend für den pH-Wert der Probe und dadurch auch für die Samenqualität, da die Motilität und der Stoffwechsel durch einen zu starken Abfall reduziert werden können. Die Untersuchung und weitere Verarbeitung des Spermas sollte schnellstmöglich nach der Gewinnung erfolgen, da die Samenqualität sonst durch einen niedrigeren pH-Wert negativ beeinflusst werden kann.

Ein signifikanter Interaktionseffekt der beiden untersuchten Faktoren auf den pH-Wert des Samens konnte durch beide statistischen Verfahren bestätigt werden. Es scheint somit eine wirkliche Abhängigkeit zwischen den beiden Faktoren Lagerungstemperatur und Untersuchungszeitpunkt vorzuliegen. Daher sollte der pH-Wert einer Samenprobe möglichst zeitnah nach der Gewinnung bei einer für Ziegensperma optimalen Lagerungstemperatur beurteilt werden.

#### **5.4 Schlussbetrachtung**

Aufgrund der eigenen Ergebnisse kann für die Untersuchung von caprinen Samenzellen folgendes Vorgehen empfohlen werden:

- Eine Lagerungstemperatur des Spermas während der Untersuchung um 20°C sollte bevorzugt werden. Auf wichtige Motilitätsparameter wie die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien

ebenso wie auf den Anteil lebender Samenzellen in den aufgetauten Proben hatte die Lagerungstemperatur vor der Untersuchung einen entscheidenden Einfluss.

- Die Anzahl lebender Samenzellen ebenso wie die Motilität nehmen mit zunehmendem Abstand zwischen der Gewinnung und dem Untersuchungszeitpunkt ab. Deshalb sollte die spermatologische Untersuchung so schnell wie möglich nach der Gewinnung erfolgen. Um die Motilität und Vitalität der Spermien nach dem Auftauen zu bestimmen ist ein Untersuchungszeitpunkt von 5 Minuten nach dem Auftauen zu empfehlen.
- Die beiden unterschiedlichen Verdünnungszeitpunkte vor dem Einfrierprozess hatten auf bestimmte morphologische Veränderungen der Spermien nach dem Auftauen einen bedeutsamen Einfluss.
- Der Verdünner (Andromed®, Fa. Minitüb, Tiefenbach), ohne Bestandteile von tierischen Proteinen, eignet sich gut für die Kryokonservierung von Ziegensperma. Ein Vorteil ist die einfache und schnelle Anwendung, da die Verdünnung des Spermas in einem Schritt erfolgt.
- Zur Beurteilung des Lebend–Tot-Verhältnisses ebenso wie für die Morphologie capriner Samenzellen kann die Färbelösung Bromphenol–Nigrosin verwendet werden. Ein Vorteil dieser Färbelösung ist die einfache Anwendung und ein guter Kontrast zwischen den gefärbten und ungefärbten Spermien.
- Der pH-Wert des Spermas sollte zeitnah nach der Gewinnung bestimmt werden, da es bereits nach zehn Minuten in beiden Versuchsansätzen zu einer Absenkung des Wertes gekommen ist.

## 5.5 Offene Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Aspekte der Samenuntersuchung von caprinen nativen und aufgetauten Samenzellen untersucht um die spermatologische Untersuchung bei dieser Tierart zu standardisieren. Folgende Arbeitsschritte sollten in weitergehenden Studien hinsichtlich ihrer Durchführung analysiert werden:

- Aufgrund der großen Temperaturspanne zwischen 20°C und 37°C sollten weitere Lagerungstemperaturen untersucht werden, um die optimale Lagerungstemperatur für Ziegensperma zu evaluieren.
- Weitere Untersuchungen über den Einfluss unterschiedlicher Auftautemperaturen auf die Qualität der kryokonservierten Samenproben von Ziegen sollten evaluiert werden.
- Die Bestimmung der Spermienkonzentration mit dem CASA-System ist bei allen Tierarten problematisch. Ein Vergleich zwischen dem klassischen Auszählverfahren mittels Zählkammer und dem Computersystem wäre sinnvoll, um die Varianz zwischen beiden Verfahren zu ermitteln und dadurch die Einstellungen des Systems für die Analyse capriner Spermien optimieren zu können.



## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der spermatologischen Untersuchungen werden verschiedene Parameter erhoben, die dazu dienen die Tauglichkeit eines Ejakulates bzw. einer Besamungsportion zu erfassen. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen darüber, welche Faktoren Einfluss auf das Ergebnis der spermatologischen Untersuchung haben. Ziel dieser Untersuchungen war es daher, mögliche Einflussfaktoren auf die spermatologische Untersuchung und Kryokonservierung von Ziegensperma zu evaluieren.

Insgesamt wurden 20 Ejakulate von fünf verschiedenen Ziegenböcken mithilfe einer künstlichen Vagina gewonnen. Die Böcke waren zu Beginn des Versuchs alle in einem Alter von neun Monaten. Unmittelbar an die Gewinnung folgte die einmalige makroskopische (Volumen, Farbe, Konsistenz, Geruch, Beimengungen) Beurteilung der Ejakulate. Für die weitere spermatologische Untersuchung wurden zwei unterschiedliche Lagerungstemperaturen gewählt. Die eine Hälfte der Ejakulate wurde bei 20°C gelagert, die andere Hälfte bei 37°C. Die pH-Wert-Messung erfolgte alle zehn Minuten bis zu einem Zeitraum von einer Stunde nach der Gewinnung mittels Indikatorpapier. Die mikroskopische Untersuchung umfasste die Bestimmung der Dichte, der Motilität, den Anteil lebender und toter Spermien sowie der Pathomorphologie. Für die Messung der Dichte und der Motilität wurde eine computer-assistierte Samenanalyse durchgeführt (AndroVision®-System, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Die Auswertung des Anteils lebender und toter Samenzellen sowie der morphologisch veränderten Spermien erfolgte mithilfe der Bromphenol-Nigrosin-Färbung. Für beide Untersuchungen wurden jeweils 200 Samenzellen ausgewertet. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte 3, 10, 15 und 30 Minuten nach der Gewinnung, mit Ausnahme der morphologisch veränderten Samenzellen, die nur einmalig zu Beginn bestimmt wurden.

Zur Kryokonservierung wurde ein Verdünner ohne Zusatz tierischer Fremdproteine gewählt (Andromed®-Verdünner, Fa. Minitüb, Tiefenbach).

Dieser Verdünnungsschritt erfolgte 15 oder 30 Minuten nach der Gewinnung des Ejakulates.

Nach 3, 5 und 10 Minuten nach dem Auftauen (20 Sekunden, 37°C) erfolgte eine mikroskopische Untersuchung der Proben. Die makroskopische und chemisch-physikalische Untersuchung sowie die Auswertung der morphologisch veränderten Samenzellen wurden einmalig zum ersten Untersuchungszeitpunkt durchgeführt.

Folgende relevante Ergebnisse wurden erzielt:

- In den Nativejakulaten hatte lediglich die kombinierte Wirkung der Faktoren Lagerungstemperatur und Untersuchungszeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf den Anteil kreisbeweglicher Samenzellen.
- Für die aufgetauten Proben war der Einfluss der Lagerungstemperatur vor der Untersuchung entscheidend für die Anzahl lebender und toter Samenzellen, sowie für alle Motilitätsparameter mit Ausnahme der kreisbeweglichen Spermien. Für alle untersuchten Parameter konnten bessere Ergebnisse erzielt werden bei einer vorherigen Lagerungstemperatur von 20°C.
- Die Anzahl lebender Samenzellen nimmt bereits bei einem Untersuchungszeitpunkt von 10 Minuten nach der Gewinnung ab.
- Für den Anteil an lebenden und toten Samenzellen in den Nativejakulaten liegt ein signifikanter Einfluss des Untersuchungszeitpunktes vor.
- Auf das Auftreten bestimmter morphologischer Veränderungen der Spermien, hat der Verdünnungszeitpunkt vor dem Einfrierprozess einen bedeutsamen Einfluss.
- Der Untersuchungszeitpunkt hat einen entscheidenden Einfluss auf den pH-Wert. Es kommt zu einem Abfall des pH-Wertes des unverdünnten Spermas mit zunehmender Lagerung vor der Untersuchung. Die Kombination der Faktoren Lagerungstemperatur und Untersuchungszeitpunkt hatte einen signifikanten Effekt auf den pH-Wert.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit bestimmte Einflussfaktoren auf das Ergebnis der spermatologischen Untersuchung und der Kryokonservierung von Ziegensperma herausgearbeitet werden. Diese Einflussfaktoren sollten in Zukunft bei der Untersuchung und Kryokonservierung von Ziegensperma berücksichtigt werden.

## 7 Summary

Various parameters are collected as part of the semen analysis. These are used to establish the suitability of an ejaculate or an insemination dose. At present, however, only a limited number of studies have assessed the factors that can affect the results of semen analysis. The aim of this study was to evaluate possible factors affecting semen evaluation and cryopreservation of goat semen.

A total of 20 ejaculates from five different bucks were obtained using an artificial vagina. At the beginning of the study all bucks were nine months old. Macroscopic evaluation (volume, color, consistency, smell, impurities) of all ejaculates was performed immediately after semen collection. For further evaluation two semen aliquots were made and assessed at different handling temperatures. Half of the ejaculates were assessed at 20°C, and the other half at 37°C. The pH of each semen sample was measured with pH-indicator-paper every ten minutes for one hour following collection. The density, motility, viability and abnormal semen morphology were examined microscopically. Density and semen motility were measured using computer assisted semen analysis (AndroVision®-System, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Evaluation of semen viability and morphological sperm alterations was performed using the bromophenol-nigrosine staining method. For each, 200 sperm cells were evaluated. Microscopic examination was carried out 3, 10, 15 and 30 minutes after semen collection, except for morphologically altered sperm, which was not further examined.

For the present study, a semen extender without animal proteins was used (Andromed® extender, Fa. Minitüb, Tiefenbach). This dilution step was performed 15 or 30 minutes after semen collection.

Samples were thawed quickly (20 seconds, 37°C) and microscopically examined 3, 5 and 10 minutes after thawing. Macroscopic and physicochemical evaluation, as well as assessment of morphological sperm alterations was performed once at time point 3 minutes.

Following relevant results were achieved:

- Only the combined effect of sample handling temperature, and time of assessment had a significant influence on the proportion of circular sperm cell motility.
- In the case of frozen-thawed samples, handling temperature during semen evaluation had a significant effect on the number of live and dead sperm, as well as on all other examined motility parameters except the circular motility. All assessed sperm parameters were better in samples subjected to a handling temperature of 20°C.
- The number of live sperm cells decreased with increasing study duration.
- In undiluted ejaculates the examination time point was the only factor that had a significant influence on the proportion of living and dead sperm cells.
- Time before dilution did have a significant impact on some sperm morphologic changes, such as loose heads, tail alterations and the presence of a plasma drop.
- The examination time point did have a significant effect on semen pH.

In summary, this study has identified certain factors influencing goat semen evaluation and cryopreservation. These factors should be taken into account when performing goat semen assessment and preservation in the future.

## 8 Anhang

### 8.1.1 Ergebnistabellen

Tab. 15: Ergebnisse der makroskopischen Samenuntersuchungen von Nativejakulaten (n = 20) der fünf Pfauenziegenböcke.

<b>Ziegenbock</b>	<b>Proben- nummer</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Farbe</b>	<b>Konsistenz</b>
Bock Nr. 1	1	0,5	gelb	milchig
	2	0,6	gelb	rahmig
	3	0,5	gelb	rahmig
	4	0,4	elfenbein	rahmig
	5	0,4	elfenbein	rahmig
	6	0,4	gelb	milchig
	7	0,5	elfenbein	milchig
Bock Nr. 2	1	0,5	gelb	milchig
Bock Nr. 3	1	0,4	gelb	milchig
	2	0,7	gelb	milchig
	3	0,5	gelb	rahmig
Bock Nr. 4	1	0,5	gelb	milchig
	2	0,5	elfenbein	milchig
	3	0,3	gelb	milchig
	4	0,4	gelb	milchig
Bock Nr. 5	1	0,5	gelb	milchig
	2	0,4	gelb	rahmig
	3	0,4	gelb	milchig
	4	0,8	gelb	milchig
	5	0,4	gelb	milchig

Tab. 16: Ergebnisse der Anzahl lebender und toter Samenzellen in den Nativejakulaten (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer Lagerungstemperatur von 20 Grad.

Ziegenbock	Proben-nummer	Untersuchungszeit (Minuten)	Lebend %	Tot %
Bock Nr.1	1	3	77	23
		10	49,5	50,5
		15	57	43
		30	70	30
	2	3	64	36
		10	74	26
		15	68,5	31,5
		30	59,5	40,5
	3	3	95,5	4,5
		10	98,5	1,5
		15	94	6
		30	91,5	8,5
	4	3	75,5	24,5
		10	77	23
		15	77,5	22,5
		30	72,5	27,5
	5	3	95,5	4,5
		10	84,5	15,5
		15	80,5	19,5
		30	76	24
	6	3	91,5	8,5
		10	87	13
		15	87,5	12,5
		30	85,5	14,5
	7	3	81,5	18,5
		10	76,5	23,5
		15	76,5	23,5
		30	74	26

Bock Nr.2	1	3	53,5	46,5
		10	52,5	47,5
		15	48	52
		30	51,5	48,5
Bock Nr. 3	1	3	89,5	10,5
		10	85	15
		15	64	36
		30	58	42
	2	3	76	24
		10	74	26
		15	65	35
		30	64,5	35,5
	3	3	55,5	44,5
		10	56	44
		15	47	53
		30	48	52
Bock Nr. 4	1	3	54,5	45,5
		10	51	49
		15	32,5	67,5
		30	41	59
	2	3	23	77
		10	14,5	85,5
		15	14,5	85,5
		30	12,5	87,5
	3	3	22,5	77,5
		10	21	79
		15	17,5	82,5
		30	17,5	82,5
	4	3	71,5	28,5
		10	61,5	38,5
		15	67	33
		30	64	36



Bock Nr. 5	1	3	44,5	55,5
		10	42	58
		15	37	63
		30	34,5	65,5
	2	3	62	38
		10	46	54
		15	33,5	66,5
		30	33,5	66,5
	3	3	58,5	41,5
		10	62	38
		15	60	40
		30	62,5	37,5
	4	3	57	43
		10	39	61
		15	49	51
		30	41	59
	5	3	63,5	36,5
		10	67,5	32,5
		15	63	37
		30	53	47

Tab. 17: Ergebnisse der Anzahl lebender und toter Samenzellen in den Nativejakulaten (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken bei einer Lagerungstemperatur von 37 Grad.

Ziegenbock	Proben-nummer	Untersuchungszeit (Minuten)	Lebend %	Tot %
Bock Nr.1	1	3	67	33
		10	68	32
		15	69,5	30,5
		30	61	39
	2	3	64	36
		10	52,5	47,5
		15	63	37
		30	56,5	43,5
	3	3	96	4
		10	89,5	10,5
		15	90	10
		30	63,5	36,5
	4	3	77	23
		10	77,5	22,5
		15	72,5	27,5
		30	71,5	28,5
	5	3	91	9
		10	89	11
		15	79,5	20,5
		30	79	21
	6	3	85	15
		10	82,5	17,5
		15	83	17
		30	80,5	19,5
	7	3	79	21
		10	77	23
		15	64,5	35,5
		30	68,5	31,5

Bock Nr.2	1	3	62,5	37,5
		10	62,5	37,5
		15	61	39
		30	63	37
Bock Nr. 3	1	3	73	27
		10	62,5	37,5
		15	73	27
		30	55,5	44,5
	2	3	88	12
		10	75	25
		15	70	30
		30	66,5	33,5
	3	3	52,5	47,5
		10	46,5	53,5
		15	35,5	64,5
		30	38,5	61,5
Bock Nr. 4	1	3	53,5	46,5
		10	39	61
		15	41,5	58,5
		30	32,5	67,5
	2	3	15,5	84,5
		10	10,5	89,5
		15	11,5	88,5
		30	9	91
	3	3	24,5	75,5
		10	22	78
		15	18	82
		30	13,5	86,5
	4	3	83,5	16,5
		10	88	12
		15	61	39
		30	65,5	34,5

Bock Nr. 5	1	3	53,5	46,5
		10	47,5	52,5
		15	41,5	58,5
		30	34,5	65,5
	2	3	57	43
		10	38	62
		15	41	59
		30	39	61
	3	3	54,5	45,5
		10	54,5	45,5
		15	50	50
		30	42	58
	4	3	49	51
		10	44	56
		15	48	52
		30	34	66
	5	3	74	26
		10	70	30
		15	62	38
		30	60	40

Tab. 18: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse und des generalisierten linearen Modells mit gemischten und hierarchisch gegliederten Effekten mit anschließendem Wald-Test bezüglich der Faktoren „Lagerungstemperatur“ und „Untersuchungszeitpunkt“ auf den pH-Wert der Nativejakulate (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken.

Parameter	Test	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifach-Wechselwirkungen (p-Wert)
		Lag Temp	Unt Zeit	Lag Temp x Unt Zeit
pH-Wert	Zweifaktorielle Varianzanalyse	0,0020	<0,0001	<0,0001
	Wald-Test	1,0000	<0,0001	0,0089

Tab. 19: Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalyse bezüglich der Faktoren „Lagerungstemperatur“ und „Untersuchungszeitpunkt“ auf die untersuchten Samenparameter in den Nativejakulaten (n=20) von fünf Pfauenziegenböcken.

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifach- Wechselwirkungen (p-Wert)
	Lag Temp	Unt Zeit	LagTemp x Unt Zeit
Lebend	0,3079	<0,0001	0,4582
Tot	0,3079	<0,0001	0,4582
Dichte	0,1584	0,0955	0,6873
Gesambeweglichkeit	0,1308	0,0012	0,0627
Vorwärtsbeweglichkeit	0,1308	0,0012	0,0627
Schnell bewegliche	0,0413	<0,0001	0,0559
Kreis bewegliche	0,4557	0,0700	0,0003
Langsam bewegliche	0,8390	0,6932	0,9964
Unbewegliche	0,1307	0,0012	0,0628

Tab. 20: Resultate des generalisierten linearen Modells mit gemischten und hierarchisch gegliederten Effekten mit anschließendem Wald-Test bezüglich der Faktoren „Lagerungstemperatur“ und „Untersuchungszeitpunkt“ auf die untersuchten Samenparameter in den Nativejakulaten (n = 20) von fünf Pfauenziegenböcken.

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifach- Wechselwirkungen (p-Wert)
	Lag Temp	Unt Zeit	LagTemp x Unt Zeit
Lebend	0,7549	<0,0001	0,5269
Tot	0,7549	<0,0001	0,5269
Dichte	0,8394	0,3678	0,7013
Gesamtbeweglichkeit	0,5083	0,5492	0,0752
Vorwärtsbeweglichkeit	0,5083	0,5492	0,0752
Schnell bewegliche	0,5521	0,1508	0,09
Kreis bewegliche	0,0706	0,6713	0,0077
Langsam bewegliche	0,7942	0,7954	0,9967
Unbewegliche	0,5084	0,5493	0,0754

Tab. 21: Resultate der mehrfaktoriellen Varianzanalyse bezüglich der Faktoren „Lagerungstemperatur“, „Untersuchungszeitpunkt“ und „Verdünnungszeitpunkt“ auf die untersuchten Samenparameter in den aufgetauten Proben (n = 80) von fünf Pfauenziegenböcken.

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)			Zweifach-wechselwirkungen (p-Wert)			Dreifach-wechselwirkungen (p-Wert)
	Lag Temp	Verd Zeit	Unt Zeit	Lag Temp x VerdZeit	Lag Temp x UntZeit	VerdZeit x UntZeit	LVZ
Lebend	0,0105	0,2540	0,0022	0,1861	0,9610	0,6053	0,0403
Tot	0,0105	0,2540	0,0022	0,1861	0,9610	0,6053	0,0403
Dichte	0,2100	0,9888	0,0049	0,1274	0,6735	0,6327	0,5969
GM	0,0289	0,1397	0,0008	0,7926	0,1961	0,6296	0,4720
PM	0,0289	0,1397	0,0008	0,7926	0,1961	0,6296	0,4720
FM	0,0190	0,0731	0,0026	0,5230	0,0712	0,4270	0,1120
CM	0,1570	0,0534	0,4046	0,2279	0,3213	0,0259	0,8041
SM	0,0479	0,6459	0,0041	0,7970	0,3891	0,3232	0,5999
IM	0,0289	0,1397	0,0008	0,7923	0,1959	0,6289	0,4718

Tab. 22: Resultate des generalisierten linearen Modells mit gemischten und hierarchisch gegliederten Effekten mit anschließendem Wald-Test bezüglich der Faktoren „Lagerungstemperatur“, „Untersuchungszeitpunkt“ und „Verdünnungszeitpunkt“ auf die untersuchten Samenparameter in den aufgetauten Proben (n = 80) von fünf Pfauenziegenböcken.

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)			Zweifach-wechselwirkungen (p-Wert)			Dreifach-wechselwirkungen (p-Wert)
	Lag Temp	Verd Zeit	Unt Zeit	Lag Temp x Verdzeit	Lag Temp x UntZeit	Verd Zeit x UntZeit	LVZ
Lebend	0,0244	0,4039	0,2305	0,8644	0,5213	0,6511	0,3259
Tot	0,0244	0,4039	0,2305	0,8644	0,5213	0,6511	0,3259
Dichte	0,0203	0,2594	0,7493	0,0849	0,7105	0,7763	0,8345
GM	0,0053	0,2324	0,8038	0,5645	0,4618	0,8430	0,7921
PM	0,0053	0,2324	0,8038	0,5645	0,4618	0,8430	0,7921
FM	0,0061	0,3654	0,7362	0,8671	0,2086	0,8784	0,5368
CM	0,5446	0,4991	0,5851	0,4975	0,8679	0,5321	0,8595
SM	0,0150	0,3220	0,9983	0,5035	0,6934	0,7748	0,8444
IM	0,0053	0,2325	0,8033	0,5645	0,4617	0,8425	0,7920



Tab. 23: Resultate der Poisson-Regression für gemischte hierarchische Modelle mit anschließendem Wald-Test bezüglich der morphologisch veränderten Spermien in den Nativejakulaten (n=20) und aufgetauten Proben (n = 80) von fünf Pfauenziegenböcken.

Parameter	Test	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifach-Wechselwirkungen (p-Wert)
		Lag Temp	Verd Zeit	LagTemp x Verd Zeit
Insgesamt	Wald-Test	0,411	0,357	0,803
lose Köpfe		0,721	0,001	0,230
Kopf-und Kappen-veränderungen		0,255	0,735	0,104
Schwanz-veränderungen		0,418	0,046	0,479
Plasmatropfen		0,0000528	0,033	1
Insgesamt	Wald-Test mit Hierarchie	0,413	0,361	0,804
lose Köpfe		0,725	0,001	0,24
Kopf-und Kappen-veränderungen		0,255	0,735	0,104
Schwanz-veränderungen		0,418	0,046	0,479
Plasmatropfen		0,0000528	0,033	1

## 9 Literaturverzeichnis

Aboagla E.M.E., Terada T. (2004)

Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa

Theriogenology 62 (6), 1160-1172

Allison C., Hagevoort G.R. (2009)

Artificial Insemination of Dairy Goats

New Mexico State University, Guide D-704, 1-2

Al-Ghalban A.M., Tabbaa M.J., Kridli R.T. (2004)

Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks

Small Ruminant Research 53 (1), 141-149

Amiridis G.S., Cseh S. (2012)

Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants

Animal Reproduction Science 130 (3), 152-161

Amoah E.A., Gelaye S. (1997)

Biotechnological Advances in goat reproduction

Journal of Animal Science 75 (2), 578-585

Aquino F.P., Vergara K.G., Ocampo L.C., Atabay E.d.P. (2014)

Viability of Extended Goat Semen Stored at Refrigerated Condition

Arredondo A.J.G., Gómez A.G., Vázquez-Armijo J.F., Ledezma-Torres R.A., Bernal-Barragán H., Sánchez-Dávila F. (2015)

Status and implementation of reproductive technologies in goats in emerging countries

Academic Journals 14 (9), 719-727

Aziz M.A. (2010)

Present status of the world goat populations and their productivity

Lohmann Information 45 (2), 42-52

Bailey J., Morrier A., Cormier N. (2003)

Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species

Canadian Journal of Animal Science 83 (3), 393-401

Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. (2000)

Semen Cryopreservation: A Damaging and Capacitating Phenomenon

Journal of Andrology 21 (1), 1-7

Baldassarre H., Karatzas C.N. (2004)

Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats

Animal Reproduction Science 82, 255-266

Barbas J.P., Mascarenhas R.D. (2009)

Cryopreservation of domestic animal sperm cells

Cell Tissue Bank 10 (1), 49-62

Bopape M.A., Lehloeny K.C., Chokoe T.C., Nedambale T.L. (2015)  
Comparison of Electro Ejaculator and Artificial Vagina on semen collection  
from South African indigenous goat following Assessment by Computer  
Aided Sperm Analysis  
Open Journal of Animal Science 5, 210-218

Boyazoglu J., Hatziminaoglou I., Morand-Fehr P. (2005)  
The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the  
future  
Small Ruminant Research 60, 13-23

Busch W., Fischer P. (2007)  
Künstliche Besamung bei kleinen Wiederkäuern  
In: Busch, W., Waberski, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und  
Nutztieren  
Verlag Schattauer, Stuttgart, 282-296

Chelucci S., Pasciu V., Succu S., Addis D., Leoni G.G., Manca M.E.,  
Naitana S., Berlinguer F. (2015)  
Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane  
integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation  
Theriogenology 83 (6), 1064-1074

Choe C.Y., Kim J.G., Cho S.R., Son D.S., Kim Y.K., Balasubramanian S.,  
Choe S.Y., Rho G.J. (2006)  
Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal  
characters in Korean native bucks

Reproduction in Domestic Animals 41, 55-60

Colleau J.J., Clément V., Martin P., Palhière I. (2011)

Optimized diffusion of buck semen for saving genetic variability in selected dairy goat populations

BMC genetics 12, 25

Cseh S., Faigl V., Amiridis G.S. (2012)

Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants

Animal Reproduction Science 130, 187-192

Dhurvey M., Gupta V.K., Nema S.P., Patidar A., Shivhare M., Singh N., Shakya V. (2012)

Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review

Double Helix Research International Journal of Biomedical and Life Sciences 3, 62-83

Dorado J., Hidalgo M., Muñoz A., Rodríguez I. (2009)

Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples

Animal Reproduction Science 112, 150-157

Dorado J., Rodríguez I., Hidalgo M. (2007)

Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination

Theriogenology 68 (2), 168-177

Dorado J., Muñoz-Serrano A., Hidalgo M. (2010)

The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability

Animal Reproduction Science 121 (1), 115-123

Dubeuf J.P., Morand-Fehr P., Rubino R. (2004)

Situation, changes and future of goat industry around the world

Small Ruminant Research 51, 165-173

Dýrmundsson Ó.R. (2004)

Sustainability of sheep and goat production in North European countries- from the Arctic to the Alps

Small Ruminant Research 62 (3), 151-157

Esteso M.C., Rodríguez E., Toledano-Díaz A., Castaño C., Pradiee J., López-Sebastián A., Santiago-Moreno J. (2015)

Descriptive analysis of sperm head morphometry in Iberian ibex (*Capra pyrenaica*): Optimum sampling procedure and staining methods using Sperm-Class Analyzer®

Animal Reproduction Science 155, 42-49

Fatet A., Pellicer-Rubio M.T., Leboeuf B. (2011)

Reproductive cycle of goats

Animal Reproduction Science 124 (3), 211-219

Fischerleitner F. (2007)

Künstliche Besamung bei Ziegen

### 3. Fachtagung für Ziegenhaltung in Raumberg-Gumpenstein, 31-35

Foot R.H. (2010)

The history of artificial insemination: Selected notes and notables

Journal of Animal Science 80, 1-10

Gacitua H., Arav A. (2005)

Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen

Theriogenology 63 (3), 931-938

Gibbons A., Cueto M. (2011)

Cryopreservation and diffusion of goat genetic material in the Argentine Patagonia

Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. 19. 2011 05 25-27, 25 al 27 de mayo, 2011. Recife, Brasil. BR

Gimenez D., Rodning S. (2007)

Reproductive management of sheep and goats

Alabama A&M and Auburn Universities ANR-1316, 1-12

Greyling J.P.C., Grobbelaar J.A.N. (1982)

Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques

South African Journal of Animal Science 13 (4), 250-252

Haenlein G.F.W. (1995)

Status and prospects of the dairy goat industry in the United States

Journal of Animal Science, 74(5), 1173-1181

Haenlein G.F.W. (2004)

Goat milk in human nutrition

Small Ruminant Research 51, 155-163

Hammerstedt R.H., Graham J.K., Nohlan J.P. (1990)

Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive

Journal of Andrology 11(1), 73-88

Hesse N., Krutzinna C., Rahmann G. (2002)

Milchziegen auf Biobetrieben in Deutschland

Ökologie und Landbau 124, 30-31

Hoffmann, B. (2003a)

Samengewinnung und Beurteilung

In: Hoffmann, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und  
Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung

Verlag Lehmanns Media, Berlin, 5 – 19

Hoffmann, B. (2003b)

Samenbeurteilung

In: Hoffmann, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und  
Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung

Verlag Lehmanns Media, Berlin, 19 – 28

Hoffmann, B. (2003c)



Pathomorphologie der Samenzelle

In: Hoffmann, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und  
Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung

Verlag Lehmanns Media, Berlin, 59 – 63

Hoffmann, B. (2003d)

Künstliche Besamung (KB)

In: Hoffmann, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und  
Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung

Verlag Lehmanns Media, Berlin, 85 – 106

Holt W.V. (2000)

Basic aspects of frozen storage of semen

Animal Reproduction Science 62, 3-22

Holt W.V. (2000)

Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and  
individual differences

Theriogenology 53, 47-58

Holtz W. (2005)

Recent developments in assisted reproduction in goats

Small Ruminant Research 60, 95-110

Janett F., Fuschini E., Keo S., Thun R. (2005)

Comparison of AndroMed® and TRIS-egg yolk extender for  
cryopreservation of buck semen

Reproduction of Domestic Animals 40, 356 (abstract)

Jiménez-Rabadán P., Ramón M., García-Álvarez O., Maroto-Morales A., del Olmo E., Pérez-Guzmán M.D., Bisbal A., Fernández-Santos M.R., Garde J.J., Soler A.J. (2012)

Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates

Animal Reproduction Science 132, 88-95

Karagiannidis A., Varsakeli S., Karatzas G. (2000)

Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece

Theriogenology 53 (6), 1285-1293

Karger S., Arlt S., Geiser B., Grau M., Heuwieser W. (2014)

Motility in cryopreserved canine semen should be evaluated 5 minutes after thawing

Reproduction of Domestic Animals 49 (s1), 26

Kathiravan P., Kalatharan J., Karthikeya G., Rengarajan K., Kadirvel G. (2011)

Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system- a review

Reproduction in Domestic Animals 46 (1), 165-172

Koopmann R., Fischer P. (2005)

Künstliche Besamung bei Ziegen

Bioland 06, 14-15

Kozdrowski R., Dubiel A., Bielas W, Dzięciol M. (2007)

Two protocols of cryopreservation of goat semen with the use of  
Computer-Assisted Semen Analysis System

Acta Veterinaria Brno, 76(4), 601-604

Lemma A. (2011)

Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility

INTECH Open Access Publisher

Leboeuf B., Manfredi E., Boue P., Piacère A., Brice G., Baril G., Broqua  
C., Humblot P., Terqui M. (1998)

Artificial insemination of dairy goats in France

Livestock Production Science 55, 193-203

Leboeuf B., Restall B., Salamon S. (2000)

Production and storage of goat semen for artificial insemination

Animal Reproduction Science 62, 113-141

Loetz E. (2013)

Increase your goat conception rate by improving your AI technique

Proceedings of the 28<sup>th</sup> Annual Goat Field Day, Langston University

López-Sebastian A., González-Bulnes A., Carrizosa J.A., Urrutia B., Díaz-  
Delfa C., Santiago-Moreno J., Gómez-Brunet A. (2007)

New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats  
based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-  
breeding season

Theriogenology 68, 1081-1087

Loubser P.G., van Niekerk C.H. (1983)

Seasonal changes in sexual activity and semen quality in the Angora ram.

2. Semen volume, quality and freezability

South African Journal of Animal Science 13, 161-163

Mara L., Dattena M., Pilichi S., Sanna D., Branca A., Cappai P. (2007)

Effect of different diluents on goat semen fertility

Animal Reproduction Science 102, 152-157

McKusick B.C., Thomas D.L., Goofredson R.G., Zelinsky R.D., Berger Y.M. (1998)

A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes

Proceedings 46th annual spooner sheep day, 32-39

Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L. (2002)

Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?

Theriogenology 57, 327-344

Morand-Fehr P., Boutonnet J.P., Devendra C., Dubeuf J.P., Haenlein G.F.W., Holst P., Mowlem L., Capote J. (2004)

Strategy for goat farming in the 21st century

Small Ruminant Research 51, 175-183

Naing S.W., Haron A.W., Goriman A.K., Yusoff R., Bakar M.Z.A., Sarsaifi K., Bakar M.M., Thein M., Kyaw T., San M.M. (2011)

Effect of seminal plasma removal, washing solutions, and centrifugation regimes on boer goat semen cryopreservation

Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science 34(2), 271-279

Naqvi S.M.K., Kumar D. (2015)

Assisted reproductive technologies in small ruminants

Perspectives of Reproductive Health Research on a Post-2015 Development Framework, 14(6), 21

Notter D.R. (2012)

Genetic improvement of reproductive efficiency of sheep and goats

Animal Reproduction Science 130(3), 147-151

De Oliveira I.R.S., Alves H.M., Castelo T.S., Bezerra F.S.B., Bezerra A.C.D.S. Silva A.R. (2013)

Correlations between hypoosmotic swelling test and the classical evaluation of goat semen

Ciência Animal Brasileira, 14(2), 216-221

Panhwar F. (2008)

Modern reproductive methods for goat production

<http://elewa.org/animalmanagement/Moderngoatreproductivemethods.pdf>

Pellicer-Rubio M.T., Combarrous Y. (1998)

Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60

Journal of Reproduction and Fertility 112, 95-105

Pérez B., Mateos E. (1996)

Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds

Small Ruminant Research 23, 23-28

Petrunkina A.M. (2007)

Fundamental aspects of gamete cryobiology

Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 4 (2), 78-91

Pezzanite L., Bridges A., Neary M., Hutchens T. (2010)

Breeding soundness examinations of rams and bucks

Purdue Extension Publications AS-599-W

Pogorzelski S.A: (2006)

Untersuchungen zur Kryokonservierung von Schafspermien unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Verdünner, Verdünnungsprotokolle und Einfriermethoden auf die Spermienqualitätsparameter

München, Ludwig-Maximilians-Universität, Dissertation

Purdy P.H. (2006)

A review on goat sperm cryopreservation

Small Ruminant Research 63 (3), 215-225

Ramukhithi F.V., Nedambale T.L., Sutherland B., Lehloeny K.C. (2011)

Cryopreservation of South African indigenous goat semen

African Journal of Biotechnology 10 (77), 17898-17902

Ridler A.L., Smith S.L., West D.M. (2012)

Ram and buck management

Animal Reproduction Science 130, 180-183

Ritar A.J., Salamon S. (1983)

Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat

Australian Journal of Biological Sciences 36, 49-59

Ritar A.J., Mendoza G., Salamon S., White I.G. (1992)

Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat  
(*Capra hircus*)

Journal of Reproduction and Fertility 95, 97-102

Rodríguez-Martínez H. (2013)

Semen evaluation techniques and their relationship with fertility

Animal Reproduction, 10(3), 148-159

Roof D.J., Bowley S., Price L.L., Matsas D.J. (2012)

Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat  
semen without sperm washing

Theriogenology 77, 412-420

Salamon S., Maxwell W.M.C. (2000)

Storage of ram semen

Animal Reproduction Science 62, 77-111

Salvador I., Viudes-de-Castro M.P., Bernacer J., Gómez E.A., Silvestre M.A. (2005)

Factory affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadina goats: a field assay

Reproduction in Domestic Animals 40, 526-529

Santiago-Moreno J., Coloma M.A., Dorado J., Pulido-Pastor A., Gómez-Guillamon F., Salas-Vega R., Gómez-Brunet A., López-Sebastián A. (2009)

Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season

Theriogenology 71 (8), 1253-1260

Sariözkan S., Bucak M.N., Tuncer P.B., Taşdemir U., Kinet H., Ulutaş P.A. (2010)

Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm

Theriogenology 73 (3), 316-323

Steyn J.J. (2009)

Application of artificial insemination (AI) on commercial sheep and goat production

RAMSEM (Pty) Ltd, South Africa, 1-13



Sultana F., Husain S.S., Khatun A., Apu A.S., Khandoker M.A.M.Y. (2013)

Study on buck evaluation based on semen quality and fertility

Bangladesh Journal of Animal Science 42 (2), 101-108

Summermatter P., Fuschini E. (1995)

Spermaproduktion bei Böcken von schweizerischen Ziegenrassen

Reproduction in Domestic Animals 30, 129-132

Tha D.D. (2005)

Artificial Insemination and freezing goat semen-new techniques in Vietnam

Goat and Rabbit Research Center, Sontay, Hatay, Vietnam, 85-88

Thurston L.M., Watson P.F., Holt W.V. (2002)

Semen cryopreservation: A genetic explanation for species and individual variation?

CryoLetters 23, 255-262

Tuli R.K., Holtz W. (1995)

Effect of season on the freezability of boer goat semen in the northern temperate zone

Theriogenology 43, 1359-1363

Vallecillo A., Trigo P.I., Delgado J.V., Cabello A., Santos E., Tenorio T. (2004)

Effects of cryopreservation on sperm motility in Blanca Serrana Andaluza goat

South African Journal of Animal Science 34, 116-118

Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. (2002)

Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice

Theriogenology 57, 149-179

Vidal A.H., Batista A.M., da Silva E.C.B., Gomes W.A., Pelinca M.A., Silva S.V., Guerra M.M.P. (2013)

Small Ruminant Research 109, 47-51

Waberski, D., Petrunkina A.M. (2007)

Spermatologie

In: Busch, W., Waberski, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren

Verlag Schattauer, Stuttgart, 99-109

Watson P.F. (2000)

The causes of reduced fertility with cryopreserved semen

Animal Reproduction Science 60, 481-492

Wehrend A., Bostedt H. (2013)

Untersuchungsmethoden beim männlichen Großtier

In: Moritz A. (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin

Verlag Schattauer, Stuttgart, 523-527

Weitze K.F. (2001)

Andrologie beim Ziegenbock

In: Busch W., Holzmann A. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Andrologie:

Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren

Verlag Schattauer, Stuttgart, 244-245

Weitze K.F., Petrunkina A.M. (2007)

Samenkonservierung, biochemische Grundlagen und Prinzipien der  
Einfrier - und Auftautechniken

In: Busch, W., Waberski, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und  
Nutztieren

Verlag Schattauer, Stuttgart 119-132

## 10 Danksagung

Herrn Prof. Wehrend danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, sowie die wertvollen Anregungen und schnellen Korrekturen.

Außerdem bedanke ich mich bei Franzl für ihre Tipps rund um den AndroVision® und die Kryokonservierung von Ziegensperma.

Vielen Dank an Herrn Dr. K. Failing und Frau Sparenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung meiner Untersuchungsergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Lisa, die sich viel Zeit und Geduld mit mir für das Training der Ziegenböcke und die Auswertung der Proben genommen hat. Du warst mir immer eine große Hilfe.

Ebenso danke ich Christian und Markus für die Unterstützung und hervorragende Fixierung der Ziegen bei den Probengewinnungen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich bei meinem Berufswunsch und der Dissertation jederzeit unterstützt haben. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich stets motiviert weiter zu arbeiten. Ihr seid ein unentbehrlicher Rückhalt in meinem Leben.

Außerdem möchte ich meinen Geschwistern danken, die obwohl sie dem Thema der Doktorarbeit nicht viel abgewinnen konnten, mich trotzdem immer motiviert haben.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Kirsten Hahn



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**ISBN: 978-3-8359-6516-4**



9 783835 196516 4